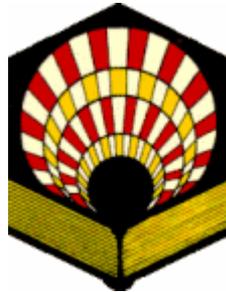


UNIVERSIDAD DE CORDOBA



FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS
ALIMENTOS**

TESIS DOCTORAL

*Desarrollo y Validación de modelos matemáticos para la
predicción de vida comercial de productos cárnicos*

M^a DEL ROCIO RODRIGUEZ PEREZ

CORDOBA, 2003

*Desarrollo y Validación de modelos matemáticos para la
predicción de vida comercial de productos cárnicos*

Tesis que presenta la Licenciada D^a M^a del Rocío Rodríguez Pérez para optar al
título de Doctor en Veterinaria

La Doctoranda

Fdo. M^a del Rocío Rodríguez Pérez

V^oB^o

Los Directores

Fdo. Prof. Dr Gonzalo Zurera Cosano

Fdo. Profa. Dra. Rosa M^a García Gimeno

Fdo. Prof. Dr César Hervás Martínez

GONZALO ZURERA COSANO PROFESOR TITULAR Y ROSA MARIA GARGIA GIMENO PROFESORA TITULAR DEL AREA DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE CORDOBA. CESAR HERVAS MARTINEZ PROFESOR CATEDRATICO DEL DEPARTAMENTO DE INFORMATICA Y ANALISIS NUMERICO.

INFORMAN:

Que el trabajo presentado por la Licenciada D^a M^a del Rocío Rodríguez Pérez con el título *“Desarrollo y Validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos”* se ha desarrollado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, durante los años 1999, 2000, 2001, 2002 y 2003, considerando que reúne los requisitos necesarios para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente informe en Córdoba a 22 de Mayo de 2003.

Fdo. Prof. Dr Gonzalo Zurera Cosano

Fdo. Profa. Dra. Rosa M^a García Gimeno

Fdo. Prof. Dr César Hervás Martínez

A mis padres y hermanos

*"A veces sentimos que lo que hacemos
es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos
si le faltara una gota"*
(Madre Teresa de Calcuta)

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

A los Profesores Dra. Dña. Rosa María García Gimeno, Dr. D. Gonzalo Zurera Cosano y Dr. D. César Hervás Martínez, por su confianza depositada en mí desde el principio, por la orientación y enseñanzas en la labor de investigación, por su escucha y por su ejemplo de constancia y dedicación.

A la CICYT por la concesión del proyecto ALI 98-0676 CO2-01 que ha servido de sustento económico para el desarrollo de la parte experimental de esta Tesis.

A la Junta de Andalucía por la concesión de la Beca FPI disfrutada durante el desarrollo de este trabajo.

Al Profesor Dr. D. Diego Santiago Laguna por su orientación y apoyo constante desde el comienzo de mis estudios de Licenciatura, por su interés y disponibilidad, así como por la gran confianza depositada en mí.

Al Profesor Dr. D. Francisco Rincón León por su inestimable colaboración en la elaboración de parte de este trabajo.

A las Doctoras Ana M^a Castillejo Rodríguez y Elena Barco Alcalá por su enseñanza y ayuda en las horas de laboratorio, por su apoyo y sobre todo por su amistad.

A todos los demás miembros del Departamento, por todos los buenos momentos que hemos compartido, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis amigos por su ánimo y su interés por “mis bichitos”.

A mis padres y a mis hermanos por su confianza y fe en mí, por enseñarme el valor de la constancia y del esfuerzo. Por su disponibilidad y ayuda, por su apoyo y ánimo en todo momento...por estar siempre ahí.

ABREVIATURAS

A_f: Factor exactitud

a_w: actividad agua

BAL: Bacterias ácido lácticas

B_f: Factor sesgo

DO: unidades de densidad óptica

FMM: Food MicroModel

MPA: Microbiología Predictiva de alimentos

Q: calidad sensorial global

RMSE: Raíz del error cuadrático medio

RN: Redes Neuronales

RS: Respuesta en Superficie

R²: Coeficiente de regresión múltiple

SEP: Error Estándar de Predicción

T: Temperatura

ufc: Unidades formadoras de colonias

λ: Fase de adaptación

μ_{max}: Tasa máxima específica de crecimiento

y_{End}: Densidad máxima de población

INDICE

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISION BIBLIOGRAFICA	7
3.1. Microbiología predictiva	7
3.1.1. Introducción	7
3.1.2. Antecedentes históricos y perspectiva actual	9
3.1.3. Clasificación de modelos los predictivos	10
3.1.3.1 Modelos cinéticos y probabilísticos	10
3.1.3.2. Modelos empíricos y mecanicistas	13
3.1.3.3. Modelos primarios, secundarios y terciarios	14
3.1.3.3.1. Modelos primarios	14
3.1.3.3.2. Modelos secundarios	22
3.1.3.3.3. Modelos terciarios	36
3.1.4. Desarrollo, colección de datos y validación de los modelos	38
3.1.4.1. Diseño y planteamiento de los modelos	38
3.1.4.2. Acumulación de datos	40
3.1.4.3. Ajuste de los datos	43
3.1.4.4. Validación de los modelos	44
3.1.4.4.1. Comparación gráfica	47
3.1.4.4.2. Comparación matemática	47
3.1.5. Limitaciones y carencias de los modelos predictivos	50
3.1.5.1. Limitaciones estadísticas	50
3.1.5.2. Limitaciones biológicas	50
3.1.5.2.1. Interacciones entre microorganismos	51
3.1.5.2.2. Estructura de los alimentos	51
3.1.5.2.3. Diversidad de cepas	51
3.1.5.2.4. Modelar la fase de adaptación	52
3.1.5.2.5. Modelos predictivos de microorganismos alterantes	53
3.1.6 Aplicaciones de la microbiología predictiva	53
3.1.6.1. Estudios de vida media	54
3.1.6.2. Investigación y formulación de productos	55
3.1.6.3. Análisis de peligros y puntos críticos de control	55

3.1.6.4. <i>Estimación del riesgo</i>	56
3.1.6.5. <i>Educación</i>	57
3.1.6.6. <i>Otras aplicaciones</i>	57
3.1.7. Futuro de la microbiología predictiva	58
3.2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	60
3.2.1. Introducción	60
3.2.2. Características de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	64
3.2.2.1. <i>Morfología</i>	64
3.2.2.2. <i>Crecimiento y metabolismo</i>	64
3.2.2.3. <i>Cultivo y aislamiento</i>	65
3.2.3. Papel de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en la alteración de alimentos	66
3.3. <i>Productos cárnicos cocidos</i>	66
3.3.1. Introducción	66
3.3.2. Alteración de productos cárnicos cocidos envasados	68
3.3.2.1. <i>Microorganismos alterantes</i>	68
3.3.2.2. <i>Tipos de alteración microbiológica</i>	70
3.3.3. Microorganismos patógenos	73
3.3.4. Conservantes de productos cárnicos cocidos	74
3.3.4.1. <i>Cloruro sódico</i>	74
3.3.4.2. <i>Nitritos</i>	75
3.3.4.3. <i>Lactato sódico</i>	76
3.3.4.4. <i>Polifosfatos</i>	76
3.3.5. Envasado de productos cárnicos	76
3.3.5.1. <i>Tipos de envasado de productos cárnicos</i>	78
3.3.5.2. <i>Efectos del envasado sobre los microorganismos</i>	79
3.3.6. Análisis sensorial	80
3.3.6.1. <i>Evolución histórica</i>	80
3.3.6.2. <i>Concepto de análisis sensorial y definiciones</i>	81
3.3.6.3. <i>Objetivos y funciones</i>	83
3.3.6.4. <i>Tipos de pruebas sensoriales</i>	85
3.3.6.4.1. <i>Pruebas discriminantes</i>	84
3.3.6.4.2. <i>Pruebas afectivas</i>	85
3.3.6.4.3. <i>Pruebas descriptivas</i>	86

3.3.6.5. <i>Jueces y condiciones de prueba del análisis sensorial</i>	87
3.3.6.5.1. <i>Jueces</i>	87
3.3.6.5.2. <i>Condiciones de prueba</i>	88
3.3.6.5.3. <i>Análisis sensorial de productos cárnicos</i>	89
4. MATERIAL Y METODOS	91
4.1. Material	91
4.2. Métodos	93
4.2.1. Evaluación microbiológica de productos cárnicos cocidos	93
4.2.1.1. <i>Microorganismos patógenos</i>	94
4.2.1.2. <i>Microorganismos alterantes</i>	95
4.2.2. Elaboración de modelos predictivos de crecimiento	
de <i>L. mesenteroides</i>	97
4.2.2.1. <i>Diseño experimental</i>	97
4.2.2.2. <i>Cepa de estudio</i>	99
4.2.2.3. <i>Elaboración de la recta de calibrado</i>	99
4.2.2.4. <i>Preparación de los medios de cultivo</i>	100
4.2.2.5. <i>Preparación del inóculo</i>	100
4.2.2.6. <i>Obtención de las curvas de crecimiento mediante</i>	
el <i>Bioscreen C</i>	101
4.2.2.7. <i>Ajuste de los datos de crecimiento al modelo primario</i>	102
4.2.2.8. <i>Ajuste de los parámetros cinéticos a modelos secundarios</i>	104
4.2.2.8.1. <i>Modelo de Respuesta en Superficie</i>	105
4.2.2.8.2. <i>Modelo de Redes Neuronales Artificiales</i>	105
4.2.5. Validación de modelos predictivos de crecimiento	
de <i>L. mesenteroides</i>	109
4.2.5.1. <i>Validación matemática</i>	109
4.2.5.2. <i>Validación en productos cárnicos</i>	109
4.2.5.3. <i>Validación en jugo de productos cárnicos</i>	111
4.2.5.4. <i>Validación con datos obtenidos de la literatura</i>	112
4.2.5.5. <i>Validación con el programa FMM</i>	112
4.2.6. Aplicación de los modelos predictivos	113
4.2.6.1. <i>Determinación del periodo de vida comercial</i>	113
4.2.6.1.1. <i>Vida comercial observada</i>	113
4.2.6.1.2. <i>Vida comercial predictiva</i>	121
4.2.6.2. <i>Formulación y desarrollo de nuevos productos</i>	122

4.2.7. Análisis estadístico.....	123
5. RESULTADOS Y DISCUSION	125
5.1. Evaluación microbiológica de los productos cárnicos.....	125
5.1.1. <i>Brochothrix thermosphacta</i>	125
5.1.2. Bacterias psicrotrofas	127
5.1.3. Bacterias ácido lácticas	130
5.2. Elaboración de modelos predictivos de crecimiento microbiano	133
5.2.1. Modelo primario.....	134
5.2.2. Efecto de los factores ambientales en el comportamiento de <i>L. mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	138
5.2.2.1. <i>Temperatura</i>	141
5.2.2.2. <i>pH</i>	142
5.2.2.3. <i>Cloruro sódico</i>	142
5.2.2.4. <i>Nitrito sódico</i>	143
5.2.2.5. <i>Atmósfera gaseosa</i>	143
5.2.3. Modelos Secundarios.....	144
5.2.3.1. <i>Respuesta en Superficie</i>	144
5.2.3.1.1. <i>RS en aerobiosis</i>	144
5.2.3.1.2. <i>RS en anaerobiosis</i>	148
5.2.3.2. <i>Redes Neuronales Artificiales</i>	151
5.2.3.2.1. <i>RN en aerobiosis</i>	152
5.2.3.2.2. <i>RN en anaerobiosis</i>	161
5.3. Validación de los modelos predictivos	168
5.3.1. Validación matemática	169
5.3.1.1. <i>Representación gráfica</i>	169
5.3.1.2. <i>Indices matemáticos y estadísticos</i>	175
5.3.2. Validación en productos cárnicos	187
5.3.2.1. <i>Comportamiento de BAL en productos cárnicos cocidos</i>	187
5.3.2.2. <i>Representación gráfica</i>	192
5.3.2.3. <i>Indices matemáticos y estadísticos</i>	197
5.3.3. Validación en jugo de productos cárnicos.....	202
5.3.3.1. <i>Representación gráfica</i>	202
5.3.3.2. <i>Indices matemáticos y estadísticos</i>	207
5.3.4. Validación con datos obtenidos de la literatura	221
5.3.5. Validación con el programa FMM	226

5.4. Selección de modelos predictivos	231
5.5. Aplicación de los modelos predictivos	231
5.5.1. Estimación de vida comercial	232
5.5.1.1. Análisis sensorial	232
5.5.1.2. Vida comercial observada	233
5.5.1.3. Vida comercial predictiva	239
5.5.2. Formulación de nuevos productos	241
6. CONCLUSIONES	243
7. RESUMEN	247
8. SUMMARY	249
9. BIBLIOGRAFIA	251

I. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

El deterioro de los alimentos debido a la acción de los microorganismos alterantes es un problema de gran importancia social y económica que afecta tanto a las industrias alimentarias como a los consumidores. Concretamente, en el caso de los productos cárnicos, uno de los grupos microbianos más importantes responsables de su alteración son las bacterias ácido lácticas, como *Leuconostoc mesenteroides*. Así pues, es importante conocer la capacidad de crecimiento de este microorganismo para multiplicarse en el alimento bajo condiciones asociadas a su procesado, conservación, almacenamiento y distribución.

El continuo progreso de la ciencia y la tecnología implica también el avance en el ámbito de la microbiología de los alimentos. Generalmente los métodos microbiológicos tradicionales sólo son representativos en las condiciones concretas bajo las que la matriz alimentaria es analizada y por tanto tienen un valor limitado para predecir el comportamiento de los microorganismos en condiciones variables. La microbiología predictiva, que podría superar estas limitaciones, surge entonces como una importante herramienta en la industria alimentaria para determinar el crecimiento de microorganismos patógenos y prevenir brotes de enfermedades. Igualmente podría ser de gran ayuda a la hora de controlar el deterioro de los alimentos y estimar el periodo de vida comercial de estos productos.

La microbiología predictiva tiene como principal objetivo describir matemáticamente la evolución de microorganismos de origen alimentario influidos por los factores ambientales intrínsecos (pH, a_w) y extrínsecos (temperatura, atmósfera gaseosa). Así mismo, permite cuantificar los efectos de las interacciones entre dos o más factores y determinar la interpolación de combinaciones de factores de control que no han sido estudiados explícitamente.

En la mayor parte de los alimentos el control de los microorganismos patógenos y alterantes depende de la combinación de factores que de forma conjunta permitirán inhibir y controlar el crecimiento microbiano. Los modelos matemáticos son la mejor manera de realizar predicciones del crecimiento microbiano bajo estas circunstancias (Whiting, 1995). El número de combinaciones efectivas que se pueden establecer

experimentalmente en estudios de inoculación para productos cárnicos y otros tipos de alimentos se puede reducir de forma importante usando la microbiología predictiva.

Una vez elaborado un modelo predictivo es indispensable validar la capacidad de ese modelo para describir con precisión la evolución microbiana en los alimentos frente a condiciones de almacenamiento. En las pruebas de esta validación deben incluirse condiciones de fluctuación, principalmente de la temperatura, a las que se encuentran normalmente la mayoría de los alimentos durante la distribución y almacenamiento (McMeekin y col., 1993).

Para confeccionar modelos predictivos es necesario obtener gran cantidad de datos de crecimiento del microorganismo objeto de estudio, cuestión que no se consigue mediante las medidas tradicionales de recuento en placa. De ahí que haya surgido un método alternativo como es la medición de la absorbancia en relación con el crecimiento microbiano (Dalgaard y col., 1994; Dalgaard y col., 1997; Neumeyer y col., 1997a), obteniéndose un gran número de datos de forma automática con una menor inversión de tiempo, dinero y esfuerzo (Cole, 1991). Los modelos predictivos resultantes derivados de los datos automatizados de absorbancia son normalmente bien validados con respecto a los modelos derivados de las técnicas tradicionales y estiman favorablemente la respuesta microbiana.

La microbiología predictiva está en continuo progreso y los modelos se están convirtiendo en herramientas de investigación estándar y de gran ayuda para la evaluación y diseño de procesos alimentarios. Sin embargo, aún no es posible utilizarlos como única herramienta para determinar la seguridad de alimentos y procesos, sino que es necesario comprobarlo mediante análisis de laboratorio. El factor determinante en la aceptación y utilización continuada de la microbiología predictiva en el ámbito de la microbiología de los alimentos es su implantación en las instituciones académicas e industria, cuestión que sin duda continuará ocurriendo a lo largo del estrenado siglo XXI.

En la evolución de la microbiología predictiva la mayoría de modelos matemáticos desarrollados se han centrado en el estudio del efecto de parámetros intrínsecos y extrínsecos sobre el crecimiento o inactivación de microorganismos patógenos en alimentos (Adams y col., 1991; Wijtzes y col., 1993; Sutherland y col., 1994; Eifert y col., 1996, Devlieghere y col, 2001, Barco, 2001; Castillejo- Rodríguez y col., 2002, etc). Sin embargo, son más reducidas las investigaciones que han

desarrollado modelos predictivos referentes al comportamiento de microorganismos alterantes en alimentos (Zwietering y col., 1990; Neumeyer y col., 1997a,b; Dalgaard y col., 1997; Wijtzes y col., 2001). Este es el primer trabajo de investigación donde se han elaborado modelos predictivos que describen el crecimiento del microorganismo alterante *Leuconostoc mesenteroides*. Este estudio se realiza mediante un sistema automático de medida de densidad óptica teniendo en cuenta el efecto de cinco variables (temperatura, pH, concentración de cloruro sódico, concentración de nitrito sódico y atmósfera de aerobiosis/anaerobiosis) y posteriormente se valida en productos cárnicos cocidos envasados al vacío, con el fin de estimar la vida comercial de este tipo de alimentos.

II. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos que se han propuesto en este trabajo son:

1. Determinar el principal microorganismo o microorganismos responsables de la alteración de productos cárnicos cocidos (pechuga de pollo, pechuga de pavo y jamón cocidos) envasados al vacío.
2. Estudiar el efecto de la temperatura, nivel de pH, concentración de cloruro sódico y concentración de nitrito sódico, bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis sobre el crecimiento del principal microorganismo alterante de productos cárnicos cocidos, en medio de cultivo mediante medidas de absorbancia en el analizador Bioscreen C.
3. Elaborar y comparar diversas aproximaciones matemáticas de Respuesta en Superficie y Redes Neuronales Artificiales como modelos predictivos de crecimiento del principal microorganismo alterante de productos cárnicos cocidos.
4. Validar los modelos predictivos obtenidos con datos del crecimiento del principal microorganismo alterante en medio de cultivo, en productos cárnicos cocidos envasados al vacío, en jugo de productos cárnicos, así como con datos de la literatura y con programas informáticos de modelos predictivos disponibles.
5. Estimar el periodo de vida comercial mediante la aplicación de los modelos matemáticos elaborados y compararlo con el periodo de vida comercial observado en productos cárnicos cocidos mediante análisis sensorial de las muestras.

III. REVISION BIBLIOGRAFICA

3. REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1. Microbiología Predictiva

3.1.1. Introducción

La microbiología predictiva de alimentos (MPA) se puede definir como el conocimiento detallado de las respuestas de crecimiento de los microorganismos presentes en los alimentos frente a los factores medioambientales que les afectan. Si la ecología microbiana de una operación de procesado o un producto alimentario son conocidos durante la distribución o almacenamiento, la supervivencia y/o crecimiento de un microorganismo de interés puede ser estimado, en base a una relación matemática entre la velocidad de crecimiento microbiana y las condiciones medioambientales. Esto significa que se puede estimar la calidad y seguridad alimentaria monitorizando las condiciones de almacenamiento (temperatura, atmósfera gaseosa, etc.), o las propiedades intrínsecas del alimento (a_w , valor de pH, etc.) y posteriormente, aplicando una base de modelos predictivos (McMeekin y col., 1993). La microbiología predictiva se basa en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles y de este modo es posible, desde observaciones realizadas, predecir las respuestas de esos microorganismos en otras condiciones similares (Ross y col., 2000b).

Todos los modelos son simplificaciones que representan los complejos procesos bioquímicos que controlan el crecimiento microbiano. Deben ser simplificados hasta un número razonable de factores medioambientales de entrada. Estos factores necesitan ser fácilmente medidos (por ejemplo, la temperatura y el pH) o conocidos para un alimento (por ejemplo, la concentración de sal añadida). Un factor de entrada, como la concentración de glucosa o de un péptido, necesitaría un análisis del alimento previo al uso del modelo. Por lo tanto, el modelo debe ser a la vez suficientemente complejo para aportar una predicción útil, pero lo bastante simple como para poder ser utilizable. Este equilibrio entre simplicidad y complejidad significa que no existe un modelo óptimo para todas las situaciones. Los modelos multifactoriales, de rangos amplios, basados en

cultivos en caldo, tienen aplicaciones más extensas que los diseñados para una única variable, como la temperatura, o aquellos basados en único alimento, pero son, a su vez, probablemente menos exactos que los modelos más específicos (Whiting y Buchanan, 2001).

El conocimiento del crecimiento y/o supervivencia de los microorganismos alterantes o patógenos en los alimentos es de interés para el personal implicado en la cadena de producción alimentaria, desde la producción primaria, a los procesadores, distribuidores, vendedores y finalmente los consumidores. Desde un punto de vista sanitario y económico, se deben tomar precauciones para limitar el crecimiento de estos microorganismos, pero también es importante calcular la vida media y seguridad microbiológica de un producto, en particular en una etapa específica de la cadena alimentaria.

Los modelos matemáticos basados en la cinética de Monod (1949) o de substratos se emplean en el estudio de fermentaciones y procesos biológicos relacionados. Los modelos aplicados a fermentaciones estudian normalmente sistemas con elevadas concentraciones de células que crecen en condiciones óptimas. Sin embargo, en los alimentos la identidad y concentración de los nutrientes no son siempre conocidas, y son factores típicamente no limitantes. Los microorganismos, especialmente los patógenos, se encuentran inicialmente en número reducido y a menudo en condiciones subóptimas. Por tanto, la modelización matemática en microbiología de los alimentos ha tomado un enfoque más empírico en comparación con los procesos de fermentación, concentrándose en la cinética de cultivos en lote en vez de cultivos continuos.

A pesar de sus características empíricas, estos modelos se basan en técnicas de regresión lineal o no lineal (Ratkowsky, 1993). Los datos de crecimiento o los parámetros de los modelos se ajustan a ecuaciones, mediante algoritmos interactivos basados en el método de los mínimos cuadrados. En la modelización microbiana, las interferencias entre aleatoriedad, normalidad de la distribución, interpolación en rangos ensayados en vez de extrapolaciones fuera de los rangos y especificaciones probabilísticas deben hacerse de la misma manera que para cualquier otra aplicación donde se utilice la regresión lineal o no lineal (Ratkowsky, 1993).

3.1.2. Antecedentes históricos y perspectiva actual

La modelización en Microbiología de los alimentos comenzó alrededor de 1920 con el desarrollo de métodos para el cálculo de los tiempos de destrucción térmica. Estos modelos revolucionaron la industria conservera (Goldblith y col., 1961). La posibilidad de predecir el comportamiento microbiano en los alimentos no es novedosa y existen referencias del uso de la microbiología predictiva en la literatura de la década de los años 30. Scott (1937) describió el efecto de la temperatura en el crecimiento de los microorganismos en el músculo de buey. En este trabajo se demuestra claramente la potencialidad de reunir datos cinéticos en función de las respuestas de crecimiento microbiano para predecir la vida media y seguridad de los alimentos.

En la década de los 80 un marcado incremento en la incidencia de brotes en enfermedades alimentarias condujo a un creciente conocimiento público de los requisitos para un suministro sano y seguro de los alimentos. Durante el mismo período muchos microbiólogos de los alimentos comenzaron a aceptar que los métodos microbiológicos tradicionales, para determinar la calidad y seguridad alimentaria, estaban limitados por el tiempo necesario para obtener resultados, y que los métodos indirectos dependientes de cambios químicos, físicos o fisicoquímicos no proporcionaban una respuesta hasta que no había un gran número de células. Muchos de los métodos rápidos propuestos requieren altos niveles de células antes de una respuesta evidente, mientras que otros dependen del uso de equipos muy sofisticados y caros.

Una alternativa para la tecnología en desarrollo es la microbiología predictiva. Los modelos predictivos son construidos midiendo la respuesta de los microorganismos frente a los principales factores que los controlan, como por ejemplo la temperatura, pH, atmósfera gaseosa, conservantes químicos o a_w , por separado o en conjunto. Posteriormente los modelos pueden ser aplicados para predecir la magnitud del crecimiento o muerte de los microorganismos, bajo condiciones no experimentadas.

Se ha despertado un interés internacional por la microbiología predictiva particularmente en Estados Unidos y Reino Unido, también en Australia y los países del este de Europa. Los gobiernos, los institutos de investigación y la industria están trabajando, independientemente o en colaboración, en programas para generar las bases de datos necesarias para el desarrollo de los modelos predictivos, y también en sistemas

que consigan que la información esté accesible rápidamente para un amplio rango de usuarios.

El reciente retorno de la modelización predictiva es impulsado por la proliferación de alimentos refrigerados y de vida útil limitada, el desarrollo de sistemas combinados de conservación y la aparición del computador. Las herramientas microbiológicas, matemáticas y estadísticas ya existían antes de la expansión actual. Sin embargo, sin la capacidad de difundir complicadas ecuaciones y resolverlas rápida y repetidamente en el propio ordenador, los grandes esfuerzos en investigación necesarios para estimar modelos microbianos no habrían dado fruto (Buchanan, 1993a).

3.1.3. Clasificación de los modelos predictivos

La clasificación de los modelos predictivos aún no tiene un único esquema con un completo apoyo por parte de la comunidad científica (McDonald y Sun, 1999). Sin embargo, el esquema propuesto por Whiting y Buchanan (1993) de modelos primarios, secundarios y terciarios es un avance para aumentar esa claridad que es necesaria. Además los modelos predictivos se pueden clasificar según su finalidad en modelos cinéticos o probabilísticos y según su base matemática en empíricos o mecanicistas. La disponibilidad de muchos y diferentes modelos, puede hacer que la selección del mejor modelo para un uso particular sea complicada. En situaciones determinadas se puede trabajar mejor con un modelo que con otro para algunos datos particulares.

3.1.3.1. Modelos cinéticos y probabilísticos

Dentro de la microbiología predictiva una forma de clasificación de los modelos es en función de la utilización de determinadas funciones matemáticas. Más concretamente, un modelo predictivo puede ser cinético o probabilístico. La elección de un enfoque u otro, y su aplicación específica, está ampliamente determinada por el tipo de microorganismo que se estudia y el número de variables con las que se trabaja (McDonald y Sun, 1999).

Los *modelos cinéticos* estiman la respuesta de crecimiento específica, con respecto a diferentes variables ambientales como la temperatura, el pH o la a_w (Van Boekel, 1996). Otras variables como la concentración gaseosa, el potencial de oxidoreducción, humedad relativa, contenido de nutrientes y propiedades antimicrobianas

también pueden incluirse en los modelos cinéticos. Existen buenas revisiones de la modelización cinética (Skinner y col., 1994; Baranyi y Roberts, 1994, 1995; Kovarova-Kovar y Egli, 1998; Betts y Earnshaw, 1998). Los modelos cinéticos son útiles y pueden utilizarse para predecir cambios en el número de microorganismos con respecto al tiempo, incluso cuando una variable que puede afectar al crecimiento esté cambiando. No obstante, estos modelos son laboriosos de construir puesto que requieren muchos datos de recuento microbiano (Gibson y col., 1988; McClure y col., 1994a; Baranyi y col., 1995).

Ross y McMeekin (1995) mostraron algunos problemas que se pueden presentar en la microbiología predictiva, los cuales son de carácter práctico para la aplicación de los modelos cinéticos. De particular interés, en los productos cárnicos, surge la dificultad de obtener datos seguros de las condiciones ambientales, como sucede con la temperatura en todas las etapas de producción, particularmente en el enfriamiento de las canales (Gill y col., 1991a, b). La variabilidad en los tiempos de la respuesta microbiana, como puede ocurrir con la fase de adaptación, también puede presentar problemas (McMeekin y col., 1989). Por lo tanto, la aplicación de los modelos cinéticos implica que se observe un aumento de la variabilidad con crecientes tiempos de respuesta, por ello los límites de confianza asociados con las predicciones se incrementan (McMeekin y col., 1997).

Los modelos cinéticos han sido empleados con mayor frecuencia que los probabilísticos, para modelar los efectos de variables intrínsecas y extrínsecas, particularmente la temperatura, en el crecimiento microbiano (McMeekin y col., 1997).

El uso de la probabilidad en la MPA permite la posibilidad de calcular la probabilidad de que un evento o suceso particular ocurra bajo condiciones determinadas. Los **modelos probabilísticos** estuvieron originariamente relacionados con predecir la posibilidad de que ciertos microorganismos formadores de esporas crecieran y produjeran toxinas (como *Clostridium botulinum*) para un periodo de tiempo determinado. Más recientemente, este tipo de modelos han sido extendidos para definir los límites de crecimiento de microorganismos en ambientes específicos, donde un único factor no es limitante pero en conjunto con otros sí previenen o inhiben el crecimiento microbiano.

La base que se establece para la modelización probabilística es la relación existente entre el crecimiento de las células microbianas y las propiedades fisicoquímicas del ambiente (Ross y McMeekin, 1995). La probabilidad de crecimiento microbiano puede ayudar al productor de alimentos a la hora de tomar decisiones acerca de la formulación, procesamiento, envasado y almacenamiento de un producto (Roberts, 1997).

Los modelos probabilísticos son apropiados en aquellos casos donde el conocimiento de la producción de toxinas en un alimento es un dato de interés, y sin embargo la velocidad de crecimiento proporciona escasa información (Gibson y Hocking, 1997). Tal es el caso del estudio llevado a cabo por Buchanan (1993a) en el que determina la probabilidad de que *Cl. botulinum* sobreviva en carne de vaca enlatada. Sin embargo, el principal problema que surge con este tipo de modelos es que la probabilidad cambia con respecto al tiempo, por lo tanto los modelos probabilísticos son de hecho una combinación de ambos modelos cinéticos y probabilísticos.

Ratkowsky y Ross (1995) formularon la hipótesis de que debería ser usado un modelo cinético para generar un modelo probabilístico que describa el área de crecimiento/no crecimiento. Fue propuesto un modelo logístico de regresión para determinar la probabilidad de crecimiento a varias condiciones, incluyendo pH, temperatura, sal y nitrito sódico. La unión de aproximaciones cinéticas y probabilísticas puede ser vista como una integración a la microbiología predictiva de modelos cinéticos y probabilísticos, y una unificación de la MPA y la teoría de obstáculos (Ratkowsky y Ross, 1995). Sin embargo, las razones para una aparente unión entre los modelos cinéticos y de probabilidad no están aún claras (Presser y col., 1998).

Los productos alimenticios deberían ser formulados teniendo los mínimos requerimientos para su conservación, mientras que satisfagan las preferencias de los consumidores (Presser y col., 1998). Houtsma y col., (1996) describieron el efecto combinado de la temperatura, pH y lactato sódico en el crecimiento de *Listeria innocua* en salchichón tipo bologna, en el área que tuvo en cuenta el crecimiento por encima de la concentración mínima de inhibición de lactato sódico. De esta manera, fue posible discriminar entre crecimiento y no crecimiento, y estimar el tiempo en el cual podría sucederse el crecimiento bajo unas condiciones específicas (Houtsma y col., 1993,

1994). Los modelos que describen el área de crecimiento/no crecimiento podrían ser muy beneficiosos para la industria cárnica.

3.1.3.2. Modelos empíricos y mecanicistas

Los *modelos empíricos*, como la función de Gompertz, son de interés en situaciones prácticas y simplemente describen los datos de crecimiento bajo condiciones experimentales en forma de una conveniente relación matemática (Gibson y col., 1987). Otros ejemplos de este tipo de modelos son las redes neuronales artificiales, modelos de raíz cuadrada y sus modificaciones, así como las ecuaciones polinómicas (Geeraerd y col., 1998). Estas últimas son fáciles de usar y no requieren el conocimiento particular de un proceso (Whiting, 1995). Sin embargo, estas ecuaciones no tienen fundamento teórico que avale un conocimiento biológico.

Comprender los mecanismos fundamentales que gobiernan el metabolismo celular, con producción de datos, permitirá la construcción de los *modelos mecanicistas*. Este tipo de modelos representarán los mecanismos con mayor exactitud y generarán predicciones a partir de hipótesis (Bazin y Prosser, 1992). Por lo tanto, podría ser posible la interpretación de la respuesta modelada para conocer los fenómenos y procesos (Krist y col., 1998). Baranyi y Roberts (1994) indicaron que los modelos derivados de forma mecanicista serían más fáciles de desarrollar y además la cantidad y calidad de información de los sistemas analizados incrementaría. No obstante, no se han desarrollado modelos mecanicistas completos que incorporen todas las variables intrínsecas y extrínsecas que afectan al crecimiento microbiano (Labuza y Fu, 1993; Ross y col., 1993).

La mayoría de investigadores están de acuerdo en que los modelos mecanicistas son inherentemente superiores a los modelos empíricos, por las razones citadas arriba (Van Impe y col., 1992, 1995; Zwietering y col., 1993). Actualmente los modelos disponibles son empíricos o semi-mecanicistas. Sería aconsejable que los modelos que se desarrollasen en el futuro reflejen el conocimiento que se tiene sobre la dinámica microbiana y se construyan para obtener datos de calidad (Baranyi y col., 1996).

3.1.3.3. Modelos primarios, secundarios y terciarios

Fue Davey (1992) quien solicitó la creación de una terminología que expresase el significado de la descripción y desarrollo de la modelización predictiva. En respuesta a esta demanda, y para evitar las confusiones existentes, Whiting y Buchanan (1993) propusieron un nuevo sistema de clasificación para la microbiología predictiva, de acuerdo con criterios específicos, bajo tres niveles: modelos primarios, secundarios y terciarios. En la Tabla 1 se citan algunos ejemplos.

Tabla 1. Sistema de clasificación propuesto por Whiting y Buchanan (1993)

<i>Modelos primarios</i>	<i>Modelos secundarios</i>	<i>Modelos terciarios</i>
Función de Gompertz ¹	Modelo de Belehradek (modelo de raíz	USDA Pathogen Modeling
Función de Gompertz modificada ²	cuadrada) ¹⁰	Program ¹⁹
Modelo logístico ³	Modelo de Ratkowsky (modelo de raíz	Food MicroModel ²⁰
Modelo de Baranyi ⁴	cuadrada) ¹¹	Food Spoilage Predictor ²¹
Modelo de Monod de primer orden ⁵	Modelo de Arrhenius ¹²	Expert Systems ²²
Modelo de Monod modificado ⁶	Modelos modificados de Arrhenius	
Valores <i>D</i> de inactivación térmica ⁷	(Davey o Schoolfield) ¹³	
Modelo de Whiting y Cygnarowicz ⁸	Modelos de probabilidad ¹⁴	
Modelo lineal tres fases ⁹	Valores <i>Z</i> ¹⁵	
	Modelos de respuesta en superficie o	
	polinómicos ¹⁶	
	Modelo de William-Landel Ferry ¹⁷	
	Modelo tipo gamma ¹⁸	

1, Gibson y col., (1987); 2, Zwietering y col., (1990); 3, Jason (1983), Einarsson y Erickson (1986); 4, Baranyi y col., (1993a); 5, Monod (1949); 6, Houtsma y col., (1996); 7, Brennan y col., (1990); 8, Whiting y Cygnarowicz Provost (1992); 9, Buchanan y col., (1997), Garthright (1997); 10, Belehradek (1930); 11, Ratkowsky y col., (1982); 12, Arrhenius (1889), Labuza y Riboh (1982); 13, Davey (1989, 1993), Schoolfield y col., (1981); 14, Hauschild (1982); 15, Brennan y col., (1990); 16, Draper (1988), Gibson y col., (1988); 17, Williams y col., (1955), Schaffner (1995); 18, Zwietering y col., 1996; 19, Buchanan (1991); 20, McClure y col., (1994b); 21, Neumeyer (1994), Neumeyer y col., (1997a); 22, Zwietering y col., (1992), Voyer y McKellar (1993)

3.1.3.3.1. Modelos primarios

Los modelos primarios los constituyen las expresiones matemáticas que describen el cambio del número de bacterias con el tiempo, bajo unas condiciones particulares del entorno y cultivo. La respuesta se puede medir directamente por recuento total, formación de toxina, nivel de substrato o productos del metabolismo, o

bien indirectamente, por medida de densidad óptica o impedancia. Se puede generar información acerca de los parámetros de crecimiento microbianos, como el tiempo de generación, duración de la fase de adaptación, velocidad o tasa de crecimiento exponencial y densidad máxima de población (Whiting y Buchanan, 1993, 1994; Whiting, 1995). Otros ejemplos de modelos primarios serían, el que describe los recuentos decrecientes con el tiempo durante el procesamiento térmico, tal como el ampliamente usado "tiempo de reducción decimal", o valor D, y el que describe la producción de una toxina microbiana u otro producto metabólico a lo largo del tiempo.

Ecuación de Gompertz

Gibson y col. (1987) trabajaron con la ecuación de Gompertz para ajustar curvas de crecimiento, la cual se describe a continuación:

$$Y_t = Y_0 + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (1)$$

donde Y_t es el logaritmo de ufc/ml en el tiempo, t , Y_0 es el logaritmo del inóculo, C es el cambio en el número de células entre el inóculo y la fase estacionaria, B es la velocidad o tasa de crecimiento relativa, y M es el tiempo al que se alcanza la velocidad máxima de crecimiento.

La fase de adaptación o latencia y la velocidad de crecimiento exponencial se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Fase de adaptación} = M - 1/B \quad (2)$$

$$\text{Velocidad de crecimiento exponencial} = BC/e \quad (3)$$

Junto con la fase de adaptación y la densidad máxima de población, la velocidad o tasa máxima específica de crecimiento de la curva son los parámetros cinéticos más importantes. Esta última mide la pendiente de la curva de crecimiento cuando el

microorganismo crece exponencialmente. Normalmente este parámetro es estimado decidiendo cuál es la parte de la curva que es aproximadamente lineal y posteriormente determinando la pendiente de ésta por regresión lineal (Zwietering y col., 1994a). La pendiente de la parte de la curva propuesta a ser lineal es una relación de primer orden. La representación de la ecuación de Gompertz (1) se puede observar en la Figura 1.

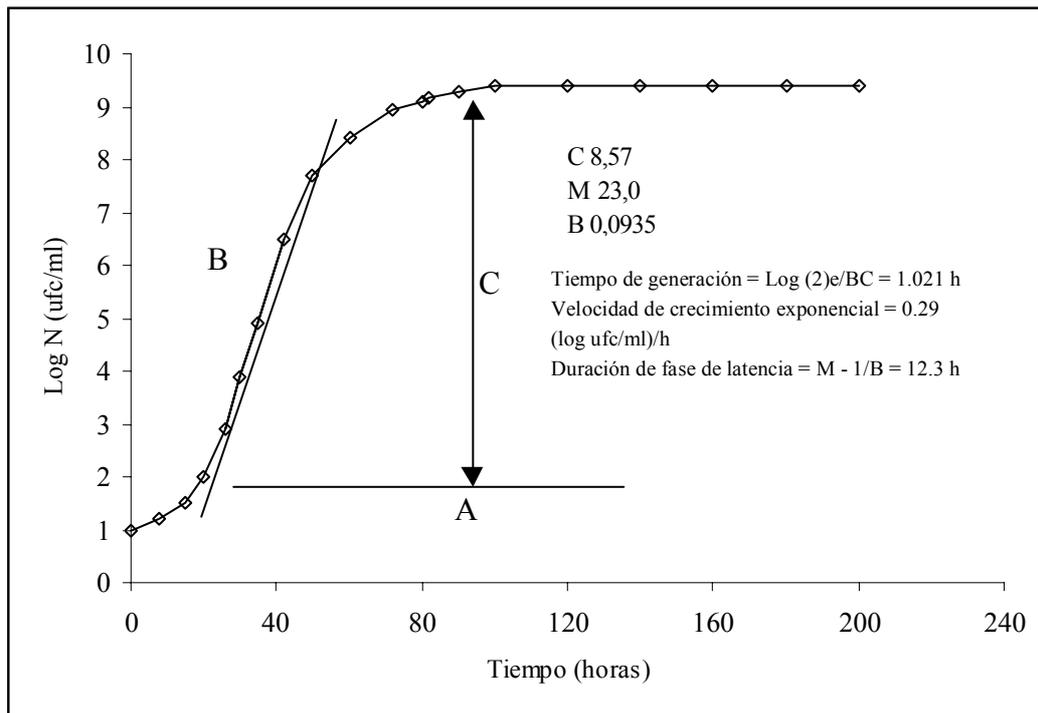


Figura 1. Representación gráfica de la ecuación de Gompertz y sus parámetros cinéticos

Zwietering y col. (1990) compararon estadísticamente diferentes curvas sigmoidales (modelo logístico, ecuaciones de Gompertz, Richards, Schnute y Stannard) usando el *t*-test y *F*-test. En la mayoría de los casos la ecuación de Gompertz se mostró como el mejor modelo para ajustar los datos de crecimiento microbiológicos, en términos de exactitud estadística y facilidad de uso.

Ecuación de Gompertz reparametrizada

La ecuación de Gompertz fue modificada (Zwietering y col., 1991), con el fin de incluir directamente en ella tres parámetros cinéticos de interés biológico: la velocidad de crecimiento (μ_m), fase de adaptación (λ) y máxima densidad de población (A). La ecuación toma la forma siguiente:

$$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_m e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4)$$

donde A es la asíntota del recuento decimal cuando el tiempo desciende indefinidamente (ufc^{-1}); y es del logaritmo del tamaño de la población; μ_m es la tasa máxima específica de crecimiento (s^{-1}); λ es la duración de la fase de adaptación (s), t es el tiempo (s).

Hasta la fecha, la ecuación de Gompertz, como se muestra en las expresiones (1) y (4), ha sido la curva sigmoideal más ampliamente utilizada en MPA debido a su simplicidad y efectividad (Gianuzzi y col., 1998). Se ha venido utilizando para describir las curvas de crecimiento de los principales microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos. Además esta ecuación es usada en los programas informáticos *FMM* y *PMP*.

A pesar de su uso extendido, la ecuación de Gompertz tiene varios inconvenientes. El período de latencia no es estrictamente horizontal y la asíntota matemática (valor numérico del inóculo) está fuera de escala en tiempos negativos. La ecuación se curva de manera continua y no existe un período de incremento lineal durante la fase de crecimiento exponencial, como sucede en la mayoría de las curvas de crecimiento. La velocidad de crecimiento exponencial viene determinada por el punto de inflexión de la curva. El proceso de ajuste tiende a proporcionar valores ligeramente mayores que los correspondientes valores de crecimiento obtenidos del período de crecimiento lineal (Whiting y Buchanan, 2001).

Ecuación de Baranyi y Roberts

Para solucionar las objeciones anteriormente citadas y aportar una base más mecanicista o biológica, el modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994) incluye una fase de crecimiento exponencial lineal, $\mu(x)$, y una fase de latencia que se calcula mediante una función de ajuste. La función de ajuste, $\alpha(t)$, se multiplica por la tasa máxima específica de crecimiento a un tiempo dado. La velocidad o tasa de crecimiento exponencial con la función de ajuste es:

$$dx/dt = \alpha(t)\mu(x)x \quad (5)$$

Las poblaciones celulares, x , están expresadas en valores aritméticos, no logarítmicos. Inicialmente la función de ajuste es 0, ya que las células no están creciendo. Con el tiempo, las células se adaptan a la nueva situación, el factor de ajuste se aumenta a 1, y las células están en su velocidad de crecimiento máxima para una combinación de condiciones ambientales dada.

La población celular máxima es incluida en:

$$\mu(x) = \mu_{max} [1 - (x/x_{max})] \quad (6)$$

Combinando estas ecuaciones, ordenando y convirtiendo a \log_{10} ufc/ml, tenemos:

$$Y_T = Y_0 + \mu_{max} A(t) - \ln\left(1 + \left\{ \frac{e^{\mu_{max} \alpha(t)} - 1}{e^{(Y_{max} - Y_0)}} \right\}\right) \quad (7)$$

donde μ_{max} es la tasa máxima exponencial de crecimiento, $A(t)$ es la integral de la función de ajuste $\alpha(t)$, e Y_{max} es el log de la densidad celular máxima (fase estacionaria).

Un concepto importante, presentado por este modelo, es que la fase de latencia observada es una combinación del estado fisiológico de la célula (q_0) y la adaptación al nuevo ambiente (ν). Una expresión de la función de ajuste es:

$$\alpha(t) = q_0 / [q_0 + \exp(-\nu t)] \quad (8)$$

La duración de la fase de latencia se calcula como sigue:

$$\lambda = \ln(1 + 1/q_0) \nu \quad (9)$$

La fase de latencia no es un suceso o proceso simple. Es el resultado de una serie de procesos que tienen lugar cuando la célula se adapta a las nuevas condiciones. Si las células no están preparadas para crecer, (q_0 reducido), o la adaptación es lenta (ν reducida), la fase de latencia será duradera.

Con microorganismos de similares condiciones previas a la inoculación, el producto de la fase de latencia y la tasa máxima específica de crecimiento es un simple cambio del estado fisiológico. Por lo tanto, las estimaciones de este producto determinarán cómo los factores medioambientales definen la tasa máxima específica de crecimiento, sin necesidad de modelar por separado la dependencia de la fase de latencia con el ambiente. Si la tasa específica de crecimiento sigue las variaciones que experimentan los factores ambientales, este modelo puede describir el crecimiento microbiano, cuando los parámetros tales como temperatura, pH y a_w , cambian con el tiempo, circunstancias que aparecen en la refrigeración de las canales cárnicas (Pin y Baranyi, 1998). Muchos investigadores han utilizado el modelo de Baranyi en aplicaciones de la microbiología predictiva y han encontrado que proporciona resultados satisfactorios, en comparación con la ecuación de Gompertz y otros modelos primarios (McClure y col., 1993a; Dalgaard, 1995; Sutherland y col., 1996, 1997; Fernández y col., 1997; McClure y col., 1997; Castillejo- Rodríguez y col., 2000).

Modelo lineal en tres fases

Buchanan y col. (1997) han desarrollado un modelo primario más sencillo que los dos anteriores, que tiene en cuenta tanto el comportamiento de células individuales como de poblaciones bacterianas. Se trata de un modelo lineal en tres fases, el cual divide la curva de crecimiento microbiano en tres fases: fase de adaptación, fase exponencial y estacionaria. Durante la fase de adaptación, se asume que las células no se dividen, puesto que se están adaptando al nuevo entorno. Por este motivo la tasa específica de crecimiento es igual a cero ($\mu=0$). Una vez adaptadas, las células comienzan a crecer hasta una velocidad que es máxima para el microorganismo en un ambiente determinado. Durante la fase exponencial se asume que la tasa específica de crecimiento es una constante ($\mu=k$), donde el logaritmo de población de células aumenta linealmente con el tiempo. Una vez alcanzada la fase estacionaria, no hay incremento en la población de células y la tasa específica de crecimiento vuelve a ser cero ($\mu=0$). Las tres fases del modelo se describen como sigue:

Fase de adaptación:

$$\text{Para } t \leq t_{LAG}, \quad N_t = N_0$$

Fase exponencial de crecimiento:

$$\text{Para } t_{LAG} \leq t \leq t_{MAX}, \quad N_t = N_0 + \mu(t - t_{LAG})$$

Fase estacionaria:

$$\text{Para } t \geq t_{MAX}, \quad N_t = N_{MAX}$$

donde: N_t , logaritmo de la densidad de población a tiempo t (Log ufc/ml); N_0 , logaritmo de la densidad de población inicial (Log ufc/ml); N_{MAX} , logaritmo de la densidad de población máxima mantenido por el ambiente (Log ufc/ml); t , tiempo transcurrido (h); t_{LAG} , tiempo en que finaliza la fase de adaptación (h); t_{MAX} , tiempo en el que se alcanza la máxima densidad de población (h); μ , tasa específica de crecimiento (Log ufc/ml h⁻¹).

Este modelo proporciona un método matemático para el ajuste de curvas de crecimiento. Se aproxima a la manera en que los microbiólogos tradicionalmente han estimado gráficamente los parámetros cinéticos de crecimiento. Una representación gráfica del modelo se puede observar en la Figura 2.

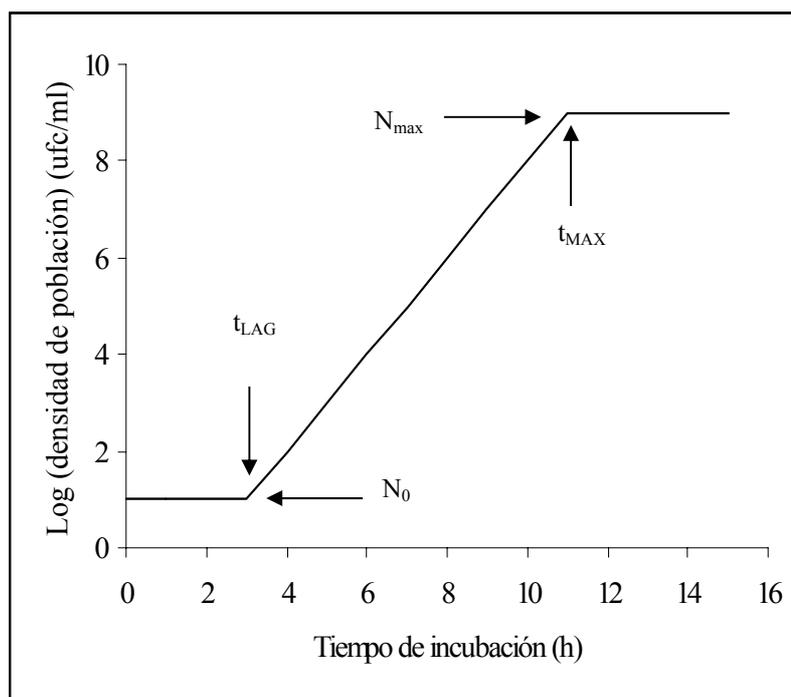


Figura 2. Representación gráfica del modelo lineal en tres fases y sus parámetros cinéticos

Buchanan y col. (1997) han establecido una comparación de este modelo lineal en tres fases frente a los modelos de Baranyi y Gompertz, para ajustar datos de crecimiento de *E. coli* O157:H7 (Buchanan y Bagi, 1994). Este modelo lineal se mostró como un modelo más simple y robusto, que los modelos sigmoidales de Baranyi y Gompertz. Su simplicidad y flexibilidad ofrecen ventajas. Proporciona valores de los parámetros de crecimiento similares a los que se obtienen con los modelos comparados, la bondad de ajustes de los tres modelos resultó ser similar.

Los modelos primarios disponibles tienen relativas ventajas e inconvenientes, no obstante, hay en general una buena concordancia entre los modelos para describir el crecimiento microbiano (Buchanan y Whiting, 1997).

3.1.3.3.2. Modelos secundarios

Los modelos secundarios están compuestos por ecuaciones que describen cómo varían los parámetros de crecimiento de los modelos primarios (tasa de crecimiento, duración fase de adaptación, etc.) con cambios en uno o más factores ambientales (temperatura, pH, a_w , atmósfera gaseosa, etc.). Ejemplos de estas ecuaciones son las basadas en las fórmulas de Arrhenius o en la de la Raíz Cuadrada (McMeekin y col., 1993; Skinner y col., 1994), particularmente si la temperatura es el principal factor de control del crecimiento, aunque dichos modelos ya han sido ampliados para incluir el pH y la a_w . Cuando se incluyen otros factores, tales como la concentración de ácidos orgánicos o nitritos, se pueden emplear ecuaciones de regresión polinomiales, las cuales son muy flexibles, con términos cuadráticos, cúbicos e interacciones, pero tienen una menor interpretación mecanicista si los comparamos con las anteriores.

En relación con la matriz alimentaria, el crecimiento microbiano depende de los efectos e interacciones de una serie de condiciones intrínsecas y extrínsecas que se detallan, a modo de ejemplo en la Tabla 2.

Tabla 2. Factores intrínsecos y extrínsecos que afectan al crecimiento microbiano

<i>Factores intrínsecos</i>	<i>Factores extrínsecos</i>
pH, naturaleza del acidulante	Temperatura
Actividad agua y naturaleza del humectante	Humedad relativa
Potencial redox	Intensidad de luz y longitud de onda
Presencia de sustancias antimicrobianas	Composición de la atmósfera gaseosa
Identidad y distribución de la microflora natural o autóctona	Características del envasado e interacciones Características del procesado e interacciones
Presencia de estructuras físicas	Consideraciones en cuanto a almacenamiento, distribución y exposición
Presencia de estructuras biológicas	
Disponibilidad de nutrientes	

Para la modelización de los factores intrínsecos y extrínsecos se utilizan aproximaciones cinéticas o probabilísticas. La mayoría de modelos probabilísticos se han centrado en estimar la seguridad de carnes procesadas con respecto a la germinación y producción de neurotoxinas por *Cl. botulinum*. La probabilidad (P) de

crecimiento puede ser modelada con una función de probabilidad logística y una ecuación polinómica (Cole y col., 1987):

$$P = \frac{1}{1 + e^{(-n)}} \quad (10)$$

Las aproximaciones actuales a la MPA han intentado comprender y establecer una conexión entre el crecimiento de los microorganismos y los factores de control del crecimiento, tales como la temperatura. Por ello, la gran mayoría de modelos secundarios están basados en aproximaciones cinéticas (Labuza y Fu, 1993), siendo los más utilizados los modelos de Arrhenius y Arrhenius modificado, y los modelos polinómicos y de raíz cuadrada.

Los factores ambientales que afectan al crecimiento pueden ser fijados en un alimento en particular. De entre todos ellos, la temperatura es considerada normalmente como el más importante, la cual afecta en gran medida a la velocidad de crecimiento. Este efecto se observa en alimentos tales como el pescado, la carne, o leche, los cuales poseen valores de a_w y pH cercanos a la neutralidad. Sin embargo, en la mayoría de los productos, la temperatura es sólo uno de la serie de factores que afectan a velocidad de crecimiento microbiano.

Ecuación de Arrhenius

La ecuación de Arrhenius fue derivada empíricamente basándose en consideraciones termodinámicas (Labuza y Riboh, 1982):

$$k = k_0 e^{-E_A / RT} \quad (11)$$

donde: k , constante de velocidad de crecimiento (s^{-1}); k_0 , constante de la ecuación de Arrhenius; E_A , energía de activación ($J mol^{-1}$); R , constante universal de los gases ($8.314 J mol^{-1} K^{-1}$); T , temperatura (K).

En esta ecuación (11) se recogen valores de k a diferentes temperaturas y se elabora una gráfica que enfrenta $\ln k$ a $1/T$. La relación entre ellas describe una pendiente con valor $-E_A/R$ (Labuza y col., 1992). Sin embargo, el crecimiento microbiano es complejo y son frecuentes las gráficas donde no se presenta linealidad (con dos pendientes). Por este motivo, la ecuación (11) no puede ajustar bien por debajo de la temperatura óptima o por encima de las temperaturas mínimas para el crecimiento. Las gráficas son únicamente exactas en un rango limitado de temperatura para el crecimiento microbiano (Labuza y Fu, 1993). Varios estudios han demostrado que esta ecuación es inadecuada para modelar respuestas de crecimiento con respecto a la temperatura en sistemas alimenticios (Ratkowsky y col., 1982; Standard y col., 1985; Phillips y Griffiths, 1987). Las modificaciones de la ecuación (11) han intentado mejorar el ajuste de este modelo en temperaturas extremas.

Ecuación de Sharpe y Michele reparametrizada

Schoolfield y col., (1981) reparametrizaron la ecuación de Sharpe y de Michele (1977) en un modelo no lineal de seis parámetros tal como sigue:

$$k(T) = \frac{\rho(25^\circ C) \frac{T}{298} \exp\left\{\frac{\Delta H_A}{R} \left(\frac{1}{298} - \frac{1}{T}\right)\right\}}{1 + \exp\left[\frac{\Delta H_L}{R} \left(\frac{1}{T_{1/2L}} - \frac{1}{T}\right)\right] + \exp\left[\frac{\Delta H_H}{R} \left(\frac{1}{T_{1/2H}} - \frac{1}{T}\right)\right]} \quad (12)$$

donde: k , velocidad de crecimiento a una temperatura T (s^{-1}); $\rho(25^\circ C)$, velocidad de crecimiento a $25^\circ C$ en ausencia de inactivación enzimática (s^{-1}); T , temperatura (K); ΔH_A , entalpía de activación de la reacción catalizada por enzima ($J \text{ mol}^{-1}$); ΔH_L , cambio en la entalpía asociado inactivación enzimática a baja temperatura ($J \text{ mol}^{-1}$); ΔH_H , cambio en la entalpía asociado inactivación enzimática a alta temperatura ($J \text{ mol}^{-1}$); $T_{1/2L}$, temperatura a la cual la enzima está 50% inactiva debido a la baja temperatura (K); $T_{1/2H}$, temperatura a la cual la enzima está 50% inactiva debido a la alta temperatura (K); R , constante universal de los gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

La temperatura de almacenamiento de la mayoría de los productos cárnicos es crítica para garantizar la seguridad microbiana en las etapas de producción y distribución. Para predecir el número de microorganismos, como una función del tiempo y temperatura, es necesario modelar la fase de latencia y la tasa específica de crecimiento como una función de la temperatura. Zwietering y col. (1991) compararon la conveniencia y utilidad del modelo de Scholfield frente a otros cinco modelos, utilizando el crecimiento de *L. plantarum* a varias temperaturas comprendidas entre 6 y 43°C. Encontraron que el modelo de Scholfield describía los datos satisfactoriamente. Sin embargo otros modelos, como por ejemplo el modelo de Ratkowsky, fue suficiente estadísticamente, más fácil de utilizar y con menos número de parámetros.

Ecuación de Davey

Davey (1989) utilizó un modelo tipo Arrhenius modificado para describir los efectos de la a_w y temperatura en la velocidad de crecimiento microbiano:

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} + C_3 a_w + C_4 a_w^2 \quad (13)$$

donde: k , velocidad de crecimiento (s^{-1}); T , temperatura (K); a_w , actividad agua; C_0 - C_4 , coeficientes.

Esta ecuación podría ser aplicada en los productos cárnicos, tales como carnes curadas o fermentadas, donde hay un descenso en los valores de a_w . Sin embargo, cuando la a_w no es un factor limitante los términos $C_3 a_w$ y $C_4 a_w^2$ pueden ser eliminados (McMeekin y col., 1992). En la ecuación (13) todos los parámetros se relacionan linealmente y por lo tanto la estimación puede hacerse utilizando regresión lineal múltiple. Davey (1989) aplicó este modelo a datos publicados en la literatura (Broughall y col., 1983; McMeekin y col., 1987) y encontró que el modelo describía bien los datos. La duración de la fase de latencia también fue modelada y las estimaciones obtenidas con el modelo coincidieron con los resultados publicados (Davey, 1991). Han sido formulados modelos, para ajustar datos bajo condiciones de temperatura extremas, que incluyen el de Arrhenius modificado, Scholfield y Davey para superar los problemas y

mejorar el modelo original de Arrhenius. Algunos autores, a la vez que describen estos modelos como efectivos, puntualizan su complejidad y naturaleza voluminosa (Buchanan, 1993a).

Ecuación de Ratkowsky

El modelo de Belehradek, publicado en 1926, fue desconocido casi totalmente en microbiología durante muchos años (Belehradek, 1930; McMeekin y col., 1993; Ross, 1993b). Fueron Ratkowsky y col. (1982) los autores que propusieron el primer uso de este modelo en microbiología de alimentos. El modelo, que también es denominado como modelo de raíz cuadrada, se muestra a continuación:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min}) \quad (14)$$

donde; k , velocidad de crecimiento (s^{-1}); T , temperatura (K); T_{min} , temperatura mínima de crecimiento (K); b , coeficiente de regresión para temperaturas por debajo de la óptima (K^{-1}).

Ratkowsky demostró que la ecuación (14) describía satisfactoriamente la relación entre la velocidad de crecimiento microbiano y la temperatura, con 50 grupos de datos de crecimiento (Ratkowsky y col., 1982) y además en 1983 con datos de 30 microorganismos (Ratkowsky y col., 1991). Pooni y Mead (1984) probaron la ecuación (14), y la compararon con otros modelos, frente a datos de 14 estudios publicados en alteración de carne de ave y encontraron que esta ecuación fue la más adecuada para predecir la alteración desde -2° hasta por encima de $15^{\circ}C$. Posteriormente este modelo fue usado con éxito para modelar el efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento microbiano en carne y carne de cordero (Smith, 1985, 1987) y *Salmonella* en carne picada de vacuno (Mackey y Kerrodge, 1988). La evaluación del deterioro de la carne y productos cárnicos, debido al crecimiento de microorganismos mesófilos, fue llevada a cabo usando funciones integradoras de la temperatura basadas en los valores de T_{min} de microorganismos mesófilos (Gill, 1985; Smith, 1985).

La ecuación fue posteriormente extendida para cubrir el rango completo de temperatura (Ratkowsky y col., 1983). Esta modificación resultó en un nuevo modelo empírico de regresión no lineal:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min})\{1 - \exp[c(T - T_{max})]\} \quad (15)$$

donde; k , velocidad de crecimiento (s^{-1}); T , temperatura (K); T_{min} , temperatura mínima de crecimiento (K); T_{max} , temperatura máxima de crecimiento (K); b , coeficiente de regresión para temperaturas por debajo de la óptima (K^{-1}); c , coeficiente de regresión para temperaturas por encima de la óptima (K^{-1}).

Los términos T_{min} y T_{max} se pueden utilizar para clasificar los microorganismos, desde un punto de vista más objetivo, en psicrófilos, mesófilos y termófilos (Ross, 1993b). Ratkowsky y col. (1983) aplicaron exitosamente la ecuación (15) a datos obtenidos a partir de 29 cepas bacterianas. Otras investigaciones han demostrado que la ecuación (15) es razonablemente efectiva para predecir los efectos de las temperaturas constantes en la velocidad de crecimiento microbiano (Chandler y McMeekin, 1985a, b; Phillips y Griffiths, 1987; Griffiths y Phillips, 1988; Buchanan y Klawiter, 1992).

Posteriormente se realizaron varias modificaciones de la ecuación (15). McMeekin y col. (1987) añadieron el término a_w a esta ecuación:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min})\sqrt{(a_w - a_{wmin})} \quad (16)$$

donde; k , velocidad de crecimiento (s^{-1}); T , temperatura (K); T_{min} , temperatura mínima de crecimiento (K); a_w , actividad agua; a_{wmin} , actividad agua mínima de crecimiento; b , coeficiente de regresión para temperaturas por debajo de la óptima (K^{-1}).

Estos autores demostraron que el modelo predecía con exactitud el efecto de la temperatura y a_w en la velocidad de crecimiento de *Staphylococcus xylosus* y

Halobacterium sp., respectivamente, en pescado curado por salazón (McMeekin y col., 1987; Chandler y McMeekin, 1989a,b). Además esta ecuación podría modelar el crecimiento de *S. aureus* sin interacción temperatura y a_w .

Adams y col. (1991) modificaron la ecuación (16) para incluir el efecto combinado de pH y temperatura utilizando una variedad de acidulantes. Demostraron que la velocidad de crecimiento, en condiciones variables de temperatura subóptima y pH, podría ser estimada utilizando esta ecuación modificada, la cual proporcionaba un buen ajuste al crecimiento de tres serotipos de *Yersinia enterocolitica*:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min})\sqrt{(pH - pH_{min})} \quad (17)$$

donde; k , velocidad de crecimiento (s^{-1}); T , temperatura (K); T_{min} , temperatura mínima de crecimiento (K); pH_{min} , pH mínimo de crecimiento; b , coeficiente de regresión para temperaturas por debajo de la óptima (K^{-1}).

Zwietering y col. (1991) realizaron unas leves alteraciones a la ecuación (17). La transformación a logaritmo natural de la ecuación (17) ha sido aplicada a datos de crecimiento de *Y. enterocolitica*. Esta transformación ha sido argumentada como más segura que la transformación a raíz cuadrada a la hora de homogeneizar la varianza (Alber y Schaffner, 1992, 1993).

McMeekin y col. (1992) sugirieron que los efectos de la temperatura, a_w y pH en el crecimiento microbiano podrían ser descritos conjuntamente con la siguiente ecuación, la cual fue usada exitosamente para predecir el crecimiento de *L. monocytogenes* por Wijtzes y col. (1993):

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min})\sqrt{(a_w - a_{wmin})}\sqrt{(pH - pH_{min})} \quad (18)$$

donde; k , velocidad de crecimiento (s^{-1}); T , temperatura (K); T_{min} , temperatura mínima de crecimiento (K); a_{wmin} , actividad agua mínima de crecimiento; pH_{min} , pH mínimo de crecimiento; b , coeficiente de regresión para temperaturas por debajo de la óptima (K^{-1}).

En la actualidad, el envasado en atmósferas modificadas de carnes frescas y productos cárnicos es una técnica de conservación muy extendida. Por lo tanto surge la necesidad de desarrollar modelos secundarios que examinen los efectos de los cambios de la composición gaseosa en el crecimiento microbiano. Recientemente, Devlieghere y col. (1999) reemplazaron el término de pH en la ecuación (18), con un término que describía la cantidad de CO_2 disuelto en productos cárnicos envasados en atmósfera modificada, con el fin de examinar el significado de este factor en la tasa máxima específica de crecimiento de *Lactobacillus sake*. El modelo demostró ser útil para predecir la vida media de productos cárnicos cocidos envasados en atmósfera modificada.

Se ha debatido y comparado los éxitos de los modelos tipo Arrhenius y de raíz cuadrada. Algunos investigadores se han inclinado por el modelo de raíz cuadrada para predecir el efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano (Pooni y Mead, 1984; Standard y col., 1985; McMeekin y col., 1989; Ratkowsky y col., 1991). Fu y col. (1991) concluyeron que ambos tipos de modelos podrían ajustar la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de *Pseudomonas fragi* a temperatura constante.

Modelo gamma

Más recientemente ha surgido el modelo gamma que se basa en la siguiente premisa: los efectos de varios factores que afectan a la velocidad de crecimiento microbiano pueden ser combinados por multiplicación, para producir un efecto promedio de los obstáculos individuales (Zwietering y col., 1996). El principio de multiplicación de efectos es consistente con la teoría de obstáculos (Leistner y Gorris, 1995). Cada uno de los diferentes efectos, temperatura, a_w y pH proporcionan por sí mismos una barrera. La ventaja de esta aproximación es que puede ser cuantificado el efecto relativo para cada factor determinante del crecimiento (te Giffel y Zwietering, 1999):

$$\gamma = \frac{\mu}{\mu_{opt}} = \gamma(T)\gamma(pH)\gamma(a_w) \quad (19)$$

donde: μ , velocidad de crecimiento (s^{-1}); μ_{opt} , velocidad de crecimiento a condiciones óptimas (s^{-1}); $\gamma(T)$, $\gamma(pH)$, $\gamma(a_w)$ factores gamma atribuidos a la temperatura, pH y a_w respectivamente.

El efecto relativo de cada variable de crecimiento puede ser descrito por el factor gamma que le corresponde, es decir:

$$\gamma(T) = \left(\frac{T - T_{min}}{T_{opt} - T_{min}} \right)^2 \quad (20a)$$

$$\gamma(pH) = \frac{(pH - pH_{min})(pH_{max} - pH)}{(pH_{opt} - pH_{min})(pH_{max} - pH_{opt})} \quad (20b)$$

$$\gamma(a_w) = \frac{(a_w - a_{w,min})}{(1 - a_{w,min})} \quad (20c)$$

Estas ecuaciones (20 a, b y c) tienen la ventaja de contener solamente parámetros interpretables, donde no aparecen coeficientes de regresión formando parte de las ecuaciones (Wijtzes y col., 2001). El modelo tipo Gamma tiene además las siguientes características: tiene en cuenta la curvatura de varias variables, está basado en los límites de crecimiento, proporciona una cuantificación de los obstáculos y el modelo se puede extender para incluir otras variables. Este modelo gamma se ha mostrado tan adecuado como otro tipo de modelos, tales como Arrhenius modificado y modelos polinómicos secundarios y terciarios (incluidos PMP y FMM), para describir el

crecimiento de *L. monocytogenes* en diversos tipos de alimentos (te Giffel y Zwietering, 1999).

Modelos de Respuesta en Superficie

Las ecuaciones polinómicas, que son característicamente de tipo lineal, pueden incluir fácilmente nuevas variables. Están elaborados a partir de una gran cantidad de datos experimentales y el efecto de una variable está descrito por una ecuación cuadrática, si las otras son constantes. Un ejemplo de este tipo de modelos, para tres variables y de segundo grado, toma la siguiente forma:

$$\mu = a + b(T) + c(T)^2 + d(pH) + e(pH)^2 + f(a_w) + g(a_w)^2 + h(T)(pH) + i(T)(a_w) + j(pH)(a_w) \quad (21)$$

donde: μ , velocidad de crecimiento (h^{-1}); $a, b, c, d, e, f, g, h, i, j$, coeficientes de regresión; T , temperatura; a_w actividad agua.

La ecuación contiene términos lineales, cuadráticos y de interacción. Cuanto más compleja es la ecuación, con interacciones o términos cuadráticos o cúbicos, más flexionada está la superficie multidimensional y más cercana a los datos. Estas ecuaciones pueden ser simplificadas eliminando términos que no son significativos estadísticamente. Debido a que la variación normalmente se incrementa al aumentar la velocidad o tasa de crecimiento o el tiempo, frecuentemente se emplean transformaciones logarítmicas, de raíz cuadrada u otras, con el fin de normalizar la varianza (Whiting y Buchanan, 2001).

Las ecuaciones polinómicas fueron usadas por Buchanan y sus colaboradores en el ARS/ USDA (Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit) para elaborar modelos que describieran el efecto de cinco variables (temperatura, concentración de NaCl, pH, atmósfera gaseosa y concentración de $NaNO_2$) sobre la respuesta de crecimiento de ocho microorganismos patógenos (McMeekin y col., 1993). Otros autores aplicaron este tipo de ecuaciones para desarrollar modelos predictivos de crecimiento de otros patógenos (Buchanan y col., 1993a; Murphy y col., 1996; Graham y col., 1996; Farber y col., 1996; Zaika y col., 1998; Nerbrink y col., 1999).

Modelos de Redes Neuronales Artificiales

Las Redes Neuronales Artificiales (RN) han sido descritas ampliamente por Haykin (1994), Najjar y col. (1997), Basheer y Hajmeer (2000) y su aplicación en microbiología predictiva es descrita por Hajmeer y col. (1997), Geeraerd y col. (1998), Mittal y Zhang, 2000; Barco (2001), Hervás y col. (2001b), Jeyamkondam y col. (2001), Castillejo (2002) y García-Gimeno y col. (2002).

El desarrollo de esta disciplina está inspirado en el principio elemental del sistema nervioso biológico. Una red neuronal artificial es un modelo estadístico-computacional, el cual tiene una estructura de red altamente interconectada que se compone de múltiples elementos simples, las neuronas o nodos, capaces de realizar simultáneamente cálculos en paralelo. A diferencia de otros modelos, como los de regresión, las Redes Neuronales Artificiales no imponen restricciones en el tipo de relación existente entre los parámetros cinéticos de crecimiento y las condiciones ambientales de estudio, como temperatura, pH, sal, etc. (Hajmeer y col., 1997).

Existen cuatro aspectos que caracterizan una red neuronal: su topología, el mecanismo de aprendizaje o ajuste, tipo de asociación realizada entre la información de entrada y de salida y por último, la forma de presentación de estas informaciones (Noriega, 1999).

La **topología o arquitectura** de las redes consiste en la organización y disposición de las neuronas en la red formando capas o agrupaciones de neuronas (Figura 3). En este sentido, los parámetros fundamentales de la red son:

- Número de niveles o capas
- Número de neuronas por capa
- Grado de conectividad entre nodos que son el número de pesos o parámetros
- Tipo de funciones de transferencia en las neuronas de las capas oculta o de salida, que puede ser de tipo lineal, sigmoideal o hiperbólica

La distribución de neuronas dentro de la red se realiza formando niveles o capas dentro de un número determinado de neuronas cada una. A partir de su situación dentro de la red, se pueden distinguir tres tipos de capas (Figura 3):

Capa de entrada. Es la capa formada por las variables independientes (temperatura, pH, concentración de NaCl, etc.).

Capas ocultas. Son internas a la red y no tienen contacto directo con el entorno exterior. Las neuronas de las capas ocultas pueden estar interconectadas de distintas maneras, lo que determina, junto con su número, las distintas tipologías de redes.

Capa de salida. Es la capa formada por las variables dependientes (tasa de crecimiento, fase de adaptación, etc.).

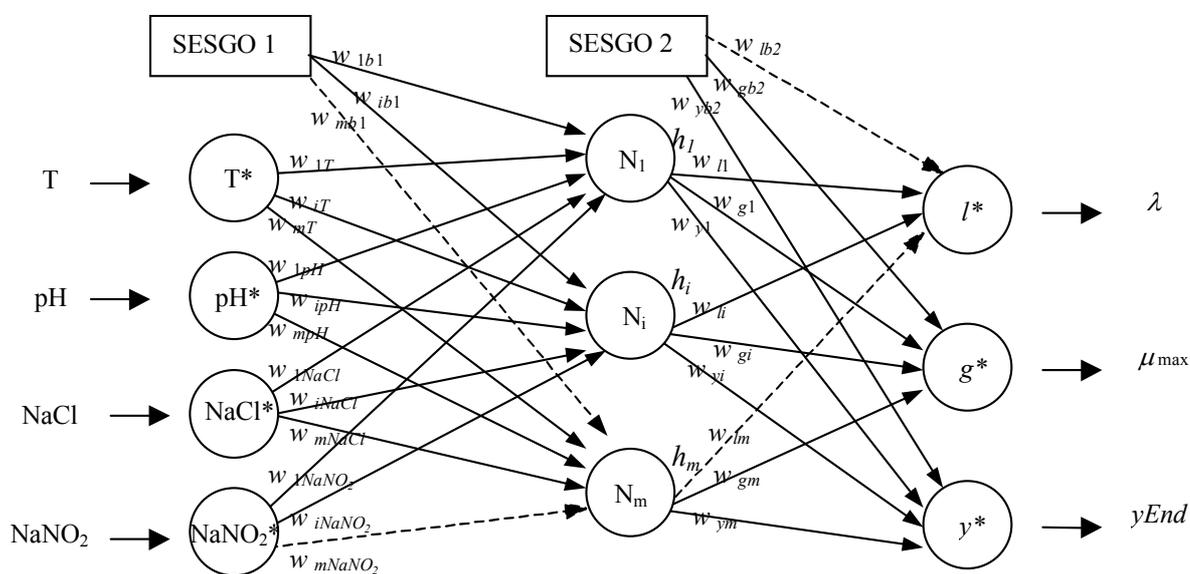


Figura 3. Arquitectura teórica de Red Neuronal Artificial para la estimación de la fase de adaptación (λ), tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) y densidad máxima de población (y_{End}). *: Variables y parámetros normalizados; l*: fase de adaptación normalizada; g*: tasa máxima de crecimiento normalizada; y*: densidad máxima de población normalizada. ----- Pesos podados.

Las redes neuronales, como modelos que se inspiran en el comportamiento de las neuronas, realizan una simplificación averiguando cuáles son los elementos relevantes del sistema, bien porque la cantidad de información de que se dispone es excesiva o bien porque es redundante.

El **aprendizaje** es el proceso por el cual una red neuronal modifica sus pesos en respuesta a una información de entrada que equivaldría al ajuste realizado en los

modelos tradicionales de regresión. Los cambios que se producen durante el proceso de aprendizaje se reducen a la destrucción, modificación y creación de conexiones entre las neuronas. En los modelos de redes neuronales artificiales, la creación de una nueva conexión implica que el peso w_{ij} de la misma pasa a tener un valor distinto de cero. De la misma forma una conexión se destruye cuando su peso pasa a ser cero. Durante este proceso de aprendizaje, los pesos de las conexiones de la red sufren modificaciones, por tanto se puede afirmar que este proceso ha terminado cuando los valores de los pesos permanecen estables. La regla o algoritmo de aprendizaje usado más comúnmente en las redes multicapas es el algoritmo de retropropagación del error. Se trata de un método de gradiente descendente para modificar los pesos de las conexiones de la red con el objeto de minimizar la suma de los errores entre los valores de salida deseados y los obtenidos por el modelo de RN.

En una red de retropropagación existe una capa de entrada con n neuronas, una capa de salida con m neuronas y al menos una capa oculta de neuronas internas. Cada capa de neuronas establece conexiones con las capas colindantes pero no se realizan conexiones entre las neuronas de la misma capa (Figura 3).

Las redes neuronales son sistemas que almacenan la información aprendida. Esta información se registra de forma distribuida en los pesos asociados a las conexiones entre neuronas. Por tanto, puede imaginarse una red como cierto tipo de memoria que almacena unos datos de forma estable, datos que se grabarán en dicha memoria como consecuencia del aprendizaje de la red y que podrán ser leídos a la salida como respuesta a cierta información de entrada, respondiendo la red con una salida asociada a cada información de entrada.

El **tipo de asociación** realizada entre la información de entrada y de salida puede ser lineal, sigmoïdal o hiperbólica.

La **forma de presentación** de estas informaciones es:

“nº nodos de entrada”: “nº nodos ocultos” **f**: “nº nodos de salida” **t**

donde **f** representa el tipo de función de transferencia (lineal, sigmoïdal o hiperbólica) hacia los nodos de la capa oculta y **t** representa el tipo de función de transferencia hacia los nodos de la capa de salida.

Las **ventajas** de las redes neuronales artificiales como alternativa para la predicción de parámetros de crecimiento de los microorganismos son:

- No imponen restricciones en el tipo de relación existente entre los parámetros cinéticos de crecimiento y las condiciones ambientales de estudio, como temperatura, pH, sal, etc. (Hajmeer y col., 1997).
- No presupone hipótesis de partida de normalidad e independencia entre las variables independientes.
- Se pueden obtener modelos multiecuacionales, con varias salidas (parámetros de crecimiento) mediante un solo modelo de red neuronal.
- Los errores en la estimación, en general, suelen ser menores.

Como **inconvenientes** se podrían citar:

- Mayor complejidad de manejo, por lo que para su elaboración se precisa de personal experto.
- Mayor tiempo de ejecución.
- Menor interpretabilidad.

En la literatura se describen numerosos estudios de **aplicación de las Redes Neuronales a la microbiología predictiva**. Geeraerd y col., (1998) estudiaron el efecto combinado de la temperatura, pH y cloruro sódico, sobre el crecimiento bacteriano en alimentos refrigerados e indicaron que las RN fue una técnica poco compleja de modelización no-lineal, que podría describir con precisión los datos experimentales en el campo de modelos secundarios en microbiología predictiva. Esta técnica de modelización, en comparación con los modelos predictivos microbianos de uso común (ecuaciones polinómicas), podría describir con mayor precisión la interacción de variables intrínsecas y extrínsecas en carnes refrigeradas. En otros trabajos donde se han comparado las redes neuronales con predicciones realizadas por ecuaciones de regresión, para datos experimentales del crecimiento de *Salmonella flexneri* (Hajmeer y col., 1997), *Escherichia coli* (Barco, 2001) y *Lactobacillus plantarum* (García-Gimeno y col., 2002), se ha observado que las RN proporcionaron mejor concordancia con los datos observados.

3.1.3.3. Modelos terciarios

Los modelos terciarios son aplicaciones de uno o más modelos primarios y secundarios, incorporados a softwares informáticos a nivel de usuario, cuyo uso facilita la aplicación de dichas ecuaciones. Actualmente hay disponibles comercialmente varios paquetes informáticos o softwares de modelización microbiana, los cuales varían en complejidad, desde una sencilla ecuación en una hoja de cálculo, a sistemas expertos o programas de simulación de estimación del riesgo. En general, los usuarios de estos programas no necesitan estar preparados en las técnicas de modelización predictiva, y como consecuencia, hacen de la microbiología predictiva una herramienta fácilmente accesible y poderosa para todas las áreas de la investigación e industria de alimentos (Buchanan 1993b; Whiting y Buchanan, 1993, 1994; Whiting, 1995).

Pathogen Modeling Program

En Estados Unidos, el ARS-USDA (Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit) ha desarrollado el *Pathogen Modeling Program* (PMP). Este software utiliza modelos con múltiples variables, basados en el uso de la función de Gompertz, en combinación con análisis de respuesta en superficie. Fue desarrollado usando gran cantidad de datos experimentales del comportamiento de microorganismos patógenos en medios líquidos (Buchanan, 1991; 1993b). La versión 6.0 de este software, editada en el 2001, contiene un modelo de inactivación térmica para *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, y modelos de crecimiento a temperaturas de refrigeración para *Cl. perfringens* y *Cl. botulinum*, como novedad.

Food MicroModel

El MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) del Reino Unido ha creado el software *Food MicroModel* (FMM), el cual fue lanzado en 1992 (McClure y col., 1994b). Este software utiliza los resultados de investigaciones en microbiología predictiva en el contexto de un sistema experto (Adair y Briggs, 1993; Jones, 1993; Voyer y McKellar, 1993). El FMM proporciona modelos predictivos para microorganismos patógenos implicados en enfermedades alimentarias, (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, etc.), así como microorganismos alterantes que

intervienen en el deterioro de los alimentos (*Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus plantarum*, etc.).

Food Spoilage Predictor

Otro software lanzado al mercado ha sido el *Food Spoilage Predictor* (FSP), desarrollado por un grupo de científicos de la Universidad de Tasmania, en Australia (Neumeyer y col., 1997a). Este programa informático es capaz de cuantificar los efectos de la temperatura en diversos alimentos (carne, pescado y lácteos) y predecir el crecimiento de especies de *Pseudomonas* alterantes. Además es capaz de relacionar la vida media de un producto a su historial de temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, el FSP requiere que el usuario tenga algunas nociones sobre informática, lo cual puede oponerse a la flexibilidad del mismo (Neumeyer, 1994; Neumeyer y col., 1997a).

Seafood Spoilage Predictor

Recientemente, se ha desarrollado un nuevo software, *Seafood Spoilage Predictor* (SSP), el cual predice e ilustra el efecto de la temperaturas y/o de los niveles de CO₂ sobre el crecimiento bacterias alterantes de productos de la pesca, como son *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreim*, y sobre la vida comercial de dichos productos (Dalgaard, 2000, Dalgaard y col., 2002).

Con la utilización de estos programas informáticos, para la estimación del crecimiento microbiano, no se puede garantizar que los valores predictivos se igualen a los observados en cualquier sistema alimenticio específico. Los investigadores han señalado las insuficiencias existentes en las fuentes actuales de información y han manifestado la necesidad de crear nuevas investigaciones para el desarrollo de softwares de modelos predictivos. Sin embargo, las investigaciones (te Giffel y Zwietering, 1999; Dalgaard y Jørgensen, 1998) han demostrado que las predicciones obtenidas con varios programas informáticos concuerdan razonablemente bien con los resultados de la literatura o de experimentos.

3.1.4. Desarrollo, colección de datos y validación de los modelos

El desarrollo de un modelo predictivo en el ámbito de la microbiología de los alimentos está básicamente fundamentado en cuatro pasos: diseño y planteamiento, colección de datos y análisis, ajuste de los datos y validación de los modelos (McMeekin y col., 1993).

3.1.4.1. Diseño y planteamiento de los modelos

En el desarrollo de un modelo predictivo es esencial conocer las necesidades de aplicación del modelo. Los experimentos se deben diseñar de tal manera que se haga el mejor uso tanto del tiempo como de los recursos. Los requerimientos de los modelos pueden depender de si el usuario necesita conocer los efectos de las variables en los microorganismos o los límites más altos o más bajos para la conservación o crecimiento. La variabilidad inherente que nos encontramos al trabajar tanto con los microorganismos como con carnes y productos cárnicos indica que los experimentos se deben diseñar para encuadrar esta variabilidad tanto como sea posible.

Una estrategia general propuesta para el diseño experimental de los modelos predictivos de crecimiento realizada por Davies (1993) incluye los siguientes pasos:

- Definir el objetivo experimental.
- Enumerar todas las variables y determinar aquellas más importantes.
- Determinar el rango de fluctuación de estas variables.
- Seleccionar el medio o sustrato más adecuado.
- Establecer las características del inóculo a utilizar (estado fisiológico, tamaño inicial, una única cepa o una mezcla, forma de inoculación, etc.).
- Determinar la posible influencia o competencia con otros microorganismos o con la flora alterante autóctona del alimento.

La realización de experimentos preliminares es de gran importancia para conseguir los objetivos planteados con una menor inversión de tiempo y esfuerzo. La reducción del número de variables independientes incorporadas al modelo, por ejemplo, puede reducir significativamente el trabajo y costes de material. Modelos predictivos

son verdaderamente difíciles de desarrollar cuando son incluidas más de cuatro variables independientes. Esto hace necesario determinar el nivel de relevancia de los parámetros intrínsecos y extrínsecos para un alimento específico y así desarrollar el modelo predictivo basado en este conocimiento (Devlieghere y col., 2001).

Muchos investigadores utilizan para sus experimentos un cultivo mezcla de las cepas más frecuentemente encontradas en los alimentos. De esta manera el crecimiento o supervivencia estimada por el modelo predictivo se corresponderá con el crecimiento más rápido de las cepas presentes (Ross y col., 1993; Whiting y Buchanan, 1994).

La mayoría de los modelos de crecimiento utilizan como inóculo cultivos crecidos durante 18-24 horas en condiciones óptimas. Así, la fase de latencia representa el tiempo de adaptación del inóculo, desde las últimas etapas de la fase logarítmica o primeras de la fase estacionaria, a las nuevas condiciones ambientales, probablemente menos favorables. La duración de la fase de latencia depende de la temperatura previa de incubación, así como de las nuevas condiciones de crecimiento (Hudson, 1993). Las células adaptadas a las altas temperaturas, y transferidas después a bajas temperaturas, tienen los períodos de latencia más prolongados. Los períodos de latencia mínimos a cada temperatura se producen con inóculos preadaptados a la misma temperatura. Una vez las células se han adaptado, las temperaturas previas no tienen efecto sobre la tasa de crecimiento. Probablemente se encontrarían efectos similares para el pH y otros cambios ambientales.

Aspectos tales como el shock por calor, la adaptación al frío, las proteínas de estrés, así como los cambios en la membrana y la síntesis de nuevo RNA y enzimas, participan en la adaptación producida durante la fase de latencia. La duración de las fases de latencia de células con deficiencias nutricionales, desecadas, en biofilms, o dañadas, no ha sido aún modelizada. Frecuentemente, el estado fisiológico de células en alimentos se relaciona más típicamente con tales condiciones. Los parámetros ν y q_0 del modelo de Baranyi y Roberts (1994) pretenden representar el estado fisiológico de la célula y el cambio del ambiente precedente al ambiente modelizado, respectivamente.

3.1.4.2. Acumulación de datos

Para la elaboración de un modelo predictivo seguro se requiere una gran cantidad de datos, que se deben recoger a lo largo de la totalidad de la curva de crecimiento, por lo que se pueden emplear varios meses de trabajo para llevar a cabo experimentos con múltiples variables de crecimiento. Desde un punto de vista estadístico, los parámetros cinéticos de crecimiento (fase de adaptación, tasa de crecimiento, nivel máximo de población) se obtienen con una buena precisión cuando se replican un número suficiente de veces las curvas de crecimiento y cuando cada réplica contiene un gran número de puntos experimentales que la describen (Begot y col., 1996).

Los métodos de acumulación de datos son variados, pero el método estándar es el **recuento en placa**, ampliamente utilizado desde los comienzos de la microbiología. Este método es el preferido para la enumeración de células, a pesar de la posible subestimación por la presencia de agregados de microorganismos en forma de cadenas o grupos. El problema se minimiza mediante el uso de frascos en agitación, y un simple examen microscópico puede determinar si se necesitan técnicas más enérgicas. Otros inconvenientes del método de recuento en placa es que no se obtienen resultados inmediatos y se consume gran cantidad de tiempo, especialmente cuando se requiere una gran cantidad de datos. No obstante, esta técnica ha sido utilizada como método estándar de referencia para los métodos alternativos indirectos que se han ido desarrollando (medidas de densidad óptica e impedancia, radiometría, determinación de ATP, flujo citométrico, etc.).

Una de las ventajas del recuento en placa es que el límite inferior de detección es tan bajo como 20 ufc/ml. El muestreo repetido del mismo frasco produce curvas más precisas que el muestreo de diferentes frascos para cada tiempo, pero incrementa la posibilidad de contaminación. Otra de las ventajas del recuento en placa es que determina sólo células viables y que puede ser usado para realizar recuentos microbianos tanto en alimentos como en medios líquidos de laboratorio (McMeekin y col., 1993).

Con el fin de paliar los inconvenientes del método de recuento en placa, se han desarrollado métodos rápidos y automáticos para la generación de datos, como la

turbidimetría y la conductividad u otras medidas eléctricas, con consideraciones similares al método turbidimétrico (Owens y col., 1989; Cuppers y Smelt, 1993).

La **conductividad** mide los cambios en las propiedades eléctricas del medio como resultado del crecimiento microbiano o metabolismo celular. Este método tiene como principal ventaja su automatización y su capacidad para el seguimiento simultáneo de muchas muestras. Sin embargo, elevados números de células (aproximadamente 10^7 - 10^8 ufc/ml) son necesarios para detectar señal, y la magnitud de la señal varía con el pH y la concentración salina. Además, este método automático puede tener una peor interpretación que el recuento total en placa (Krist y col., 1998).

La **turbidimetría** es otro método indirecto que permite estudiar el crecimiento bacteriano a partir las medidas de la densidad óptica, el cual hace posible seguir el crecimiento de una población bacteriana en tiempo real (Begot y col., 1996).

El fundamento de la técnica turbidimétrica se basa en que las células bacterianas suspendidas en un medio líquido transparente son capaces de absorber y dispersar un haz luz incidente dependiendo de su concentración, tamaño, forma, como también de su índice de refracción y longitud de onda. El crecimiento bacteriano da lugar a un incremento de la turbidez de la suspensión. La relación entre la proporción de luz que atraviesa la suspensión y la concentración de células (o densidad de población) es la siguiente:

$$\log \frac{I_{\text{incidente}}}{I_{\text{transmitida}}} = -xcl \quad (22)$$

donde: $I_{\text{incidente}}$, es la intensidad de luz que entra en la suspensión; $I_{\text{transmitida}}$, es la intensidad de luz que dispersa la suspensión; x , es una constante dependiente de las características del medio y de las células bacterianas; l , es la longitud del paso de luz; c , es la concentración de células.

La relación $\log I_{\text{incidente}}/I_{\text{transmitida}}$, se corresponde con el valor de absorbancia, o densidad óptica que puede ser detectada y medida por un espectrofotómetro. La medición de la densidad óptica es rápida, sencilla, y puede ser automatizada con instrumentos especializados, permitiendo obtener muchas medidas de un solo cultivo en función del tiempo o temperatura de incubación, por ejemplo.

Este método tiene una serie de ventajas, como que es una técnica rápida, fiable, no destructiva y económica, es relativamente fácil de automatizar y permite realizar el seguimiento simultáneo de gran número de muestras. No obstante, como inconvenientes se describen una baja sensibilidad (es necesario una densidad de población de 10^5 - 10^6 para obtener señal de medida) y una relación no directamente proporcional entre las medidas de densidad óptica y los recuentos en placa cuando las densidades celulares son elevadas. Además, este método automático puede tener una peor interpretación que el recuento total en placa (Krist y col., 1998).

Una de las limitaciones de las lecturas de absorbancia es que necesitan de un medio líquido de suspensión claro. Farkas y Mohácsi-Farkas (1998), describieron otras limitaciones, como el hecho de que la relación entre la concentración celular y la absorbancia es lineal únicamente en un rango limitado de concentración. Este rango está determinado por el límite de detección inferior, del orden de 10^6 células/ml, y el límite superior, que normalmente es menor que la concentración celular al comienzo de la fase estacionaria, por lo que, la determinación de la fase de adaptación sólo puede hacerse en cultivos densos.

En microbiología predictiva los datos son expresados normalmente en términos de parámetros de crecimiento microbiano, los cuales se pueden obtener también a partir de cambios en la densidad óptica en el rango donde la respuesta es lineal con la concentración celular. Lack y col. (1997) estudiaron el crecimiento de *Enterobacter cloacae*, *E. coli* y *L. monocytogenes* en caldo Standard-I y en jugo de lechuga por medidas turbidimétricas. Ross y McMeekin (1991) desarrollaron un modelo de crecimiento de *S. aureus* en medio líquido basado en lecturas de densidad óptica. Posteriormente Dalgaard y col. (1994) determinaron la relación existente entre la μ_{\max} obtenida a partir de recuento en placa y datos turbidimétricos para un amplio rango de especies bacterianas, con el fin de estimar el potencial de los métodos turbidimétricos en microbiología predictiva. Estos autores concluyeron que las medidas turbidimétricas pueden ser usadas con seguridad para estimar el parámetro cinético μ_{\max} . Científicos noruegos y suecos (Nerbrink y col., 1999) han desarrollado un modelo polinómico basado en datos de absorbancia para predecir el crecimiento de *L. monocytogenes* en medio líquido. En los últimos años, diversos trabajos científicos siguen constatando que la turbidimetría es un método adecuado para la elaboración de modelos de crecimiento

de microorganismos, tal y como desarrollaron Barco (2001) y Castillejo- Rodríguez y col. (2002) para *E. coli* y *S. aureus*.

Existen diversos aparatos para realizar medidas turbidimétricas, entre los que destaca el analizador *Bioscreen C* (Labsystem, Finlandia), espectrofotómetro que mide, a lo largo del tiempo, la turbidez de un cultivo líquido por trayectoria vertical, proporcionando rápidamente una gran cantidad de datos por cultivo. Una de las fundamentales ventajas del aparato es que todas las funciones del analizador son controladas por medio de un software, facilitando el trabajo en gran medida. De este modo, se pueden seleccionar diferentes parámetros, como la longitud de onda del filtro (405-600 nm), temperatura de incubación, frecuencia de agitación e intensidad, intervalo de tiempo entre dos medidas y duración del experimento. El *Bioscreen C* ofrece además la posibilidad de obtener gran cantidad de réplicas, que garantizan idénticas condiciones de incubación, lo que permite obtener satisfactoriamente datos para la microbiología predictiva. La gran versatilidad de este sistema turbidimétrico se basa, entre otras propiedades, en la posibilidad de trabajar de forma conjunta con un número elevado de muestras, hasta 200 muestras por experimento, que pueden además presentar diferentes condiciones experimentales (Barco Alcalá y col., 2000).

3.1.4.3. Ajuste de los datos

Una vez obtenidos los datos de crecimiento microbiano por cualquiera de las técnicas anteriormente descritas (recuento en placa, conductividad, turbidimetría, etc.), estos datos son ajustados a alguno de los modelos primarios existentes, de forma que se expresa la evolución de la densidad celular en función del tiempo. Así se obtienen los parámetros de crecimiento (tasa máxima específica de crecimiento, fase de adaptación, tiempo de generación, densidad máxima de población, etc.) para cada combinación de factores ambientales. En una segunda fase, los modelos secundarios son aplicados para predecir cómo varían dichos parámetros de crecimiento en función de los cambios en uno o más factores ambientales, extrínsecos o intrínsecos.

3.1.4.4. *Validación de los modelos*

Antes de la aplicación de un modelo predictivo en una situación práctica deben demostrar que predicen con exactitud el comportamiento de microorganismos en los alimentos durante el procesado, almacenamiento y distribución y en esto consiste su validación. La validación de un modelo matemático es una de las etapas más cruciales y al mismo tiempo más difícil dentro del ciclo completo de la modelización predictiva (Van Impe y col., 1996; Whiting, 1997). La validación debe realizarse en medios de laboratorio pero especialmente en productos alimenticios. Cuando el sistema, al que se aplica un modelo predictivo, se hace más complejo, aumentando el error de las predicciones (Pin y col., 1999).

El proceso de validación es un aspecto que aún no está totalmente definido en microbiología predictiva pero establece una comparación entre los parámetros cinéticos (tasa de crecimiento, tiempo de generación, etc.) estimados por los modelos y los observados en los alimentos para un mismo microorganismo (Gibson y col., 1988; Buchanan y col., 1993b; McClure y col., 1993a; Witzjes y col., 1993; Sutherland y col., 1994).

La validación de modelos predictivos se puede llevar a cabo con datos obtenidos en las mismas condiciones que los utilizados para elaborar el modelo, denominada *validación interna*, con el fin de determinar si el modelo puede describir suficientemente los datos experimentales.

La *validación externa* utiliza datos nuevos, obtenidos a partir de test de inoculación y almacenamiento o datos de tasa de crecimiento recogidos en la literatura para estimar la precisión de las predicciones dadas por el modelo. En esta validación externa se incluye la validación matemática y de producto. La validación matemática cuantifica la seguridad matemática de un modelo testado con datos experimentales nuevos. Estos datos nuevos, que no se han usado para la elaboración del modelo, se han obtenido bajo condiciones de experimentación similares, con diferente tamaño de inóculo, diferente temperatura, etc. Únicamente cuando la etapa previa de validación matemática es pasada exitosamente, es posible establecer la validación de producto (Van Impe y col., 1996). Consiste en comparar predicciones del desarrollo del microorganismo obtenidas en el laboratorio con observaciones del crecimiento en un

alimento, para determinar si las predicciones son lo suficientemente seguras para ser utilizadas.

En microbiología predictiva se han utilizado diversos métodos con el fin de comparar la bondad de ajuste de una serie de modelos a los datos utilizados para su elaboración, también se han usado métodos para determinar dónde la predicción del modelo es aceptable en relación al error inherente a los datos (Adair y col., 1989; Zwietering y col., 1990, 1994b). También figuran en textos estadísticos métodos generales para estos fines (Draper y Smith, 1981).

Witzjes y col., (1993) representaron gráficamente valores de tiempo de generación para *L. monocytogenes*, encontrados en la literatura, frente a las correspondientes predicciones de un modelo predictivo elaborado en medio de cultivo. En esta representación se podían observar fácilmente aquellas predicciones que podrían ser inseguras en la práctica y la bondad de ajuste del modelo.

Duh y Schaffner (1993) desarrollaron ecuaciones predictivas para la tasa de crecimiento de *Listeria sp.* basadas en mediciones realizadas en caldo infusión cerebro corazón. Paralelamente se añadieron datos hallados en la literatura, del crecimiento de este microorganismo en alimentos a la serie de datos y con los datos adicionales se efectuó un análisis de regresión.

La proximidad en el valor del error cuadrático medio (MSE, Mean Square Error) y los valores de R^2 , de las ecuaciones ajustadas a la serie de datos, se han tomado como indicadores de la fiabilidad de los modelos cuando se aplicaban a alimentos. Otra medida de la exactitud de las ecuaciones predictivas fue introducida por McClure y col., (1993a) quienes compararon sus modelos basándose en el sumatorio de los cuadrados de las diferencias del logaritmo natural de los valores observados y predictivos para el tiempo de generación (GT):

$$\sum (\ln(GT_{\text{observado}}) - \ln(GT_{\text{predictivo}}))^2 \quad (23)$$

El valor más pequeño indica el modelo que mejor predice la respuesta observada.

Ross (1996) ha desarrollado dos índices para evaluar la bondad de ajuste de los modelos predictivos. Estos índices, denominados factor sesgo (B_f) y exactitud (A_f), proporcionan un fácil resumen de la fiabilidad de los modelos y además sirven como primer paso en el avance del proceso de validación de modelos predictivos. El objetivo planteado para estos índices fue permitir la estimación de la bondad de ajuste de modelos predictivos, cuando se comparan con observaciones que no se han utilizado para generar el modelo, particularmente llevadas a cabo en alimentos, y de esta forma evaluar su utilidad para ayudar en la toma de decisiones en seguridad y calidad alimentaria. Un objetivo adicional propuesto fue el de proporcionar una medida simple y cuantitativa de la fiabilidad de los modelos. Desde que Ross (1996) estableciera los índices, para evaluar la bondad de ajuste de los modelos predictivos, han sido ampliamente utilizados en estudios de validación (Miles y col., 1997; Neumeyer y col., 1997b; Dalgaard y Jørgensen, 1998; Nerbrink y col., 1999; te Giffel y Zwietering, 1999; Ross y col., 2000a; Barco, 2001; Devlieghere y col., 2001; Castillejo, 2002; Castillejo-Rodríguez y col., 2002).

Es importante destacar que los usuarios de los modelos deben tener conocimiento del rango de aplicabilidad de sus modelos predictivos, como también de los límites de su fiabilidad. Cuando se considera la bondad de ajuste, un aspecto interesante es donde el modelo es peligroso, es decir, donde produce estimaciones que subestiman el riesgo de alteración o extensión del crecimiento de un microorganismo patógeno; pero los modelos también deben predecir tan próximo como sea posible al comportamiento observado para evitar pérdida excesiva de vida comercial de productos alimentarios.

En la práctica la cuestión no es necesariamente cómo de bien se ajusta un modelo a los datos sino la exactitud con la cual imita la respuesta microbiana (Jones y col., 1994). Es normal que nos encontremos desviaciones de las predicciones en alimentos complejos (Gill, 1982). Muchos investigadores han expresado la necesidad de validar modelos predictivos elaborados directamente a partir de alimentos, como por ejemplo la carne (Whiting y Masana, 1994; Walls y Scott, 1996). Por ejemplo, hay determinados componentes presentes en la formulación de productos cárnicos, ausentes en los medios de cultivo, que producen cambios en el ambiente donde se encuentra los microorganismos, y que podrían afectar significativamente la extensión en la cual el

medio ambiente podría permitir o suprimir el crecimiento. El nitrito sódico, mientras que es estable en medios de cultivo, es destruido rápidamente por la acción del ascorbato presente en muchos productos cárnicos (Riordan y col., 1998).

La idoneidad de un modelo para predecir datos puede ser evaluada gráficamente o basándose en índices matemáticos y estadísticos (te Giffel y Zwietering, 1999). A continuación se detallan distintos métodos de validación de modelos predictivos.

3.1.4.4.1. Comparación gráfica

Los valores de los parámetros cinéticos observados en los alimentos pueden ser representados gráficamente frente a las correspondientes predicciones del modelo predictivo evaluado. A partir de esta representación se pueden visualizar rápidamente aquellas predicciones que podrían resultar inseguras en la práctica, y además se puede estimar la fiabilidad del modelo. También para este fin, el examen y análisis de la presentación de los errores residuales puede ser muy útil. La representación de la transformación logarítmica de los parámetros cinéticos es más recomendable pues el error de distribución es homogéneo (te Giffel y Zwietering, 1999). La ventaja de expresar la tasa de crecimiento en escala logarítmica es que los puntos están más equitativamente dispersos sobre un rango más grande. Un inconveniente es que las desviaciones estructurales y tendencias de los datos pueden pasar desapercibidas en una representación logarítmica. En conclusión, es aconsejable y útil examinar la representación de los datos sin transformar como también de las transformaciones logarítmicas y de raíz cuadrada.

3.1.4.4.2. Comparación matemática

Se pueden usar varios índices matemáticos para evaluar la fiabilidad o bondad de ajuste de los modelos predictivos de crecimiento. Estos se describen a continuación.

Raíz del error cuadrático medio (RMSE)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (\mu_{predictiva} - \mu_{observada})^2}{n}} \quad (24)$$

El estadístico Raíz del error cuadrático medio (RMSE, Root Mean Square Error), raíz del sumatorio de los residuos al cuadrado dividido por el número de grados de libertad (n), es una medida de variabilidad residual, la cual no es explicada por los cambios deliberados en factores como la temperatura, pH y a_w . El número de grados de libertad es igual al número de datos o valores. Esta variabilidad residual puede venir causada por varios motivos incluyendo la variabilidad natural y errores sistemáticos. El valor más bajo de RMSE significa la mejor idoneidad del modelo predictivo para describir los datos (Adair y col., 1989; Sutherland y col., 1994).

Coefficiente de regresión múltiple (R^2)

El coeficiente de regresión múltiple es utilizado con frecuencia como una medida de la del ajuste total conseguido. Este coeficiente mide la fracción de la variación, alrededor de la media, que es explicada por el modelo. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción obtenida por ese modelo (Grau y Vanderline, 1993; Duffy y col., 1994; Sutherland y col., 1994).

Indices sesgo y exactitud

Proporcionan una indicación objetiva de la idoneidad o buen funcionamiento de un modelo (Ross, 1996). En contraposición a los métodos estadísticos tradicionales, estos índices no están basados en la desviación existente entre la respuesta observada y la media. Este hecho causa un problema a la hora de evaluar la fiabilidad de los modelos con nuevos datos, puesto que la principal respuesta es desconocida. Está bien documentado que estos factores son herramientas útiles para medir la fiabilidad de los modelos predictivos (Neumeyer y col., 1997b; Dalgaard y Jørgensen, 1998).

Bias o factor sesgo (B_f): este factor responde a la cuestión: ¿dónde se colocan los valores observados: por encima o por debajo de la línea de equivalencia, y también en qué medida se acerca a la concordancia perfecta?. Además proporciona una medida de la desviación estructural de un modelo. Está descrito en la ecuación siguiente:

$$B_f = 10^{\left(\frac{\sum \log\left(\frac{\mu_{predictivo}}{\mu_{observado}}\right)}{n} \right)} \quad (25)$$

donde $\mu_{predictivo}$ es el valor de la tasa máxima específica de crecimiento predictiva (h^{-1}); $\mu_{observado}$ es el valor de la tasa máxima específica de crecimiento observada (h^{-1}); n es el número de datos o valores.

Un factor sesgo > 1 indica un modelo seguro para el caso de la tasa específica de crecimiento cuyo valor observado es inferior al estimado por el modelo predictivo, en este sentido el modelo proporciona un margen de seguridad (Ross, 1996). En cambio un valor sesgo < 1 para la fase de adaptación proporcionado por un modelo significa que la predicción estimada es segura, puesto que la fase de adaptación observada es mayor que la predictiva. El factor sesgo no proporciona información del promedio de la exactitud de las estimaciones, puesto que la sobre o subestimación tiende a cancelarla. Por lo tanto se debe calcular el factor de exactitud.

Accuracy o factor de exactitud (A_f): este factor es un promedio de la distancia entre cada punto y la línea de equivalencia, como una medida de la proximidad del promedio entre las predicciones y las observaciones. Toma la siguiente forma en valor absoluto:

$$A_f = 10^{\sum \left| \log \left(\frac{\mu_{predictivo}}{\mu_{observado}} \right) \right| / n} \quad (26)$$

donde $\mu_{predictivo}$ es el valor de la tasa máxima específica de crecimiento predictiva (h^{-1}); $\mu_{observado}$ es el valor de la tasa máxima específica de crecimiento observada (h^{-1}); n es el número de datos o valores.

El valor mayor alcanzado por el A_f significa menos exactitud en la estimación. Un valor de A_f de 1,7 indica que las predicciones, en promedio, difieren un 70% de las observaciones. Si no hay desviación estructural (sesgo = 1, ambas desviaciones positiva y negativa en promedio, el modelo es exacto), la falta de exactitud pueden ser mostrada por el A_f (Ross, 1996).

Cuando ambos índices toman el valor de la unidad significa que existe concordancia perfecta entre los valores de los parámetros de crecimiento predictivos y los observados. Una buena concordancia entre los valores predictivos de tasa de

crecimiento de un microorganismo y los observados en un alimento indica que el alimento por sí mismo juega un mínimo papel en la determinación de la respuesta microbiana, contrariamente a lo que se creía que el alimento es un factor determinante. Cuando las predicciones difieren de los valores observados, la diferencia puede ser debida a factores no incluidos en el modelo, como por ejemplo, nitrito, dióxido de carbono presente en la atmósfera que rodea al alimento, etc. Si en cambio la respuesta observada difiere sustancialmente de la predicción es importante determinar la razón de esta diferencia. Algunos alimentos contienen sustancias naturales antimicrobianas, como sucede en los huevos. En otros casos la estructura del alimento juega un papel determinante, quizás porque limite la difusión de substratos u oxígeno al microorganismo, o por producción de compuestos ácidos (Robins y col., 1994).

3.1.5. Limitaciones y carencias de los modelos predictivos

Los modelos predictivos en el ámbito de la microbiología de los alimentos pueden presentar una serie de limitaciones (Whiting, 1995), cuestión que sería de gran interés abordar en el futuro próximo de la microbiología predictiva.

3.1.5.1. Limitaciones estadísticas

Una importante limitación estadística de la mayoría de los modelos primarios y secundarios actuales es una estimación de la variación alrededor del valor calculado. En condiciones extremas para el crecimiento, la variación entre réplicas llega a ser grande. Son utilizadas por tanto transformaciones para homogeneizar la varianza para el ajuste de los modelos. El logaritmo y la raíz cuadrada de los valores de los parámetros están con frecuencia más próximamente distribuidos que los mismos valores sin transformar.

3.1.5.2. Limitaciones biológicas

En la elaboración y desarrollo de un modelo predictivo es fundamental que se especifiquen claramente cuales son los límites del modelo, es decir, qué microorganismos, factores, rango de cada factor o qué combinaciones de factores proporcionarán respuestas válidas. La presencia de factores de inhibición adicionales en un alimento, que no se incluyan en el modelo, requiere tomar precauciones a la hora de la interpretación de las predicciones.

3.1.5.2.1. Interacciones entre microorganismos

La competición entre microorganismos en los alimentos no está considerada en la mayoría de los modelos predictivos y muy pocos investigadores han modelado estas interacciones. Pin y Baranyi (1998) estudiaron la interacción en el crecimiento de microorganismos alterantes en carne refrigerada comparando los modelos de crecimiento obtenidos en aislamiento de los microorganismos y los obtenidos en mezcla de cepas. Breidt y Fleming (1998) desarrollaron un modelo matemático que describe el crecimiento competitivo de cultivos celulares bacterianos (*Listeria monocytogenes* y *Lactococcus lactis*) en caldo vegetal. Más recientemente estos autores han elaborado otro modelo, en este caso relacionado con el crecimiento en competencia de bacterias en las superficies de los alimentos (Breidt y Fleming, 1999).

3.1.5.2.2. Estructura de los alimentos

La mayoría del gran número de modelos predictivos desarrollados en los últimos años no tienen en cuenta la variabilidad del crecimiento microbiano con respecto al medio en el que se desarrolla. En ambientes homogéneos, como caldos y jugos de alimentos, esta variabilidad no existe o es omitida (Vereecken y col., 1998). Sin embargo, en medios estructurados y heterogéneos, como son los alimentos, existen diferencias según la zona del producto alimenticio en relación con factores como la temperatura, pH, sal, etc., y por tanto esto influirá en el crecimiento microbiano. Además, debido a la estructura sólida de los alimentos, los microorganismos pueden ser forzados a crecer en colonias, en cuyo caso, los efectos de interacción y competición juegan un papel más importante en comparación con los productos fluidos.

3.1.5.2.3. Diversidad de cepas

La variedad de cepas de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos difieren en su respuesta en condiciones disgenéticas. Begot y col. (1997) compararon los parámetros de crecimiento de 58 cepas de *L. monocytogenes* y 8 de *L. innocua* a diferentes combinaciones de pH (5.6 y 7.0), temperatura (10 y 37°C) y actividad agua (0.96 y 1). Se observaron importantes variaciones entre las diferentes cepas para las mismas condiciones, especialmente para la fase de adaptación. Estos resultados hacen notar las dificultades en elegir una cepa apropiada para elaborar un

modelo predictivo. Si la cepa más rápida en el crecimiento es considerada, el modelo siempre predecirá una fase de adaptación más corta y una tasa de crecimiento menor que aquellas determinadas para la mayoría de las cepas, y con esto siempre se obtendrían estimaciones de crecimiento seguras. Sin embargo también podrían surgir cuestiones sobre la idoneidad y realidad de las predicciones hechas por estos modelos desarrollados con las cepas de crecimiento más rápido.

3.1.5.2.4. Modelar la fase de adaptación

En relación con los parámetros de crecimiento, la mayoría de los modelos describen la tasa de crecimiento o el tiempo de generación. La fase de adaptación es inherentemente más difícil de predecir ya que depende de factores como la identidad y fenotipo del microorganismo (Buchanan y Cygnarowicz, 1990), tamaño del inóculo (Baranyi y Roberts, 1994), estado fisiológico del inóculo (McMeekin y col., 1993) y de factores ambientales, como la temperatura (Zwietering y col., 1994b), pH, actividad agua y disponibilidad de nutrientes (Buchanan y Cygnarowicz, 1990). La pre-adaptación a las condiciones de crecimiento menos favorables puede acortar los tiempos de adaptación de forma muy importante (Buchanan y Klawitter, 1991; Kroll y Patchett, 1992; Hudson, 1993; Dufrenne y col., 1997) y la magnitud de este efecto es difícil de predecir (Robinson y col., 1998). Las predicciones del tiempo de adaptación se han mostrado mucho menos exactas que las predicciones de la tasa de crecimiento (Zwietering y Hasting, 1997a; Robinson y col., 1998).

Varios estudios han demostrado una relación entre la fase de adaptación y la tasa de crecimiento (Adair y col., 1989; Baranyi y Roberts, 1994) pero la validez general de esta relación no ha sido totalmente estudiada. Un conocimiento más profundo sobre los mecanismos de acción y sistemas de adaptación de las células microbianas frente a las condiciones disgenésicas podría conducir a obtener mejores predicciones de la fase de adaptación. Hasta entonces, sin embargo, este parámetro de crecimiento no debe ser excluido para la predicción de alteración o seguridad microbiológica de los alimentos pero es necesario una interpretación prudente de las predicciones del modelo (Devlieghere, 2000).

3.1.5.2.5. Modelos predictivos de microorganismos alterantes

Como criterio para determinar la vida media comercial de los alimentos, los modelos matemáticos pueden ser empleados para predecir el comportamiento de los principales grupos de microorganismos alterantes. Sin embargo, el desarrollo de modelos para este tipo de microorganismos no ha recibido mucha atención. Los modelos que predicen la alteración de los alimentos son normalmente muy específicos del tipo de producto, lo cual limita el desarrollo de la microbiología predictiva en este ámbito. A pesar de todo, en los últimos años las investigaciones en torno a la predicción de la alteración de los alimentos han ganado en interés (Zwietering y col., 1992; Gibson y col., 1994; Neumeyer y col., 1997a, b; Cuppers y col., 1997; Pin y Baranyi, 1998; Devlieghere y col., 1999; Olvera y col., 1999). McMeekin y Ross (1996b) señalaron que la mayoría de los modelos de alteración se refieren a productos lácteos o pesqueros, siendo pocos los relacionados con productos cárnicos (McDonald y Sun, 1999). Algunos modelos se han propuesto para describir el crecimiento de cultivos iniciadores o starter en salchichones fermentados (Bello y Sanchez-Fuertes, 1995; DoBmann y col., 1996). A pesar de esto, sólo el modelo de Aggelis y col., (1998) está disponible para predecir el crecimiento microbiano en un producto cárnico curado.

3.1.6. Aplicaciones de la microbiología predictiva

Los modelos predictivos de crecimiento microbiano son herramientas útiles para que los microbiólogos obtengan estimaciones iniciales del comportamiento microbiano. Sin embargo, es fundamental que el usuario entienda y respete las limitaciones de un modelo dado. Algunos alimentos tendrán valores ambientales fuera de aquellos empleados para construir el modelo. Los alimentos pueden contener factores adicionales no incluidos en el modelo, con influencia significativa sobre el comportamiento de un microorganismo patógeno. El uso del modelo en estas situaciones es inapropiado y dará lugar a predicciones probablemente inexactas. No obstante, una vez validados, los modelos pueden aportar información rápidamente para tomar decisiones en muchas situaciones.

Muchas han sido las aplicaciones propuestas para la MPA, siendo descritas por McDonald y Sun, (1999) las de especial relevancia para la industria cárnica.

3.1.6.1. Estudios de vida media

La modelización predictiva, que integra el comportamiento microbiano con otras variables del procesado, ha ganado terreno en el campo de la industria cárnica para la predicción de la vida media (Banks, 1994). La determinación de la vida media es un tema complejo, en tanto que es difícil predecir los efectos de la variabilidad presente en el almacenamiento de alimentos, y las condiciones de abuso que un producto puede experimentar (Williams, 1992). La gran variedad, y número de microorganismos alterantes que se pueden encontrar en los productos cárnicos, significa que los modelos de alteración son menos sencillos de elaborar, y además su aplicación es bastante más limitada (Pin y Baranyi, 1998).

Como sucede con la estimación del riesgo y APPCC, la predicción de la vida media debería considerar todas las etapas en la producción de un producto cárnico. Se deben obtener datos seguros sobre los materiales crudos utilizados, la formulación de productos, el montaje del producto, las técnicas de procesado, condiciones higiénicas, envasado utilizado, procedimientos de almacenamiento y distribución, y por supuesto manipulación del consumidor final. Únicamente cuando todas estas áreas están representadas puede ser posible establecer una predicción segura de vida media (Dalgaard, 1995; McMeekin y Ross, 1996b). Seguir un procedimiento para calcular la vida media puede implicar una utilización extensa de fuentes tecnológicas y financieras. Sin embargo, el desarrollo de modelos predictivos seguros podría reducir en gran medida la magnitud de estas fuentes y mejorar la utilización del tiempo (Neumeyer y col., 1997a).

Se han llevado a cabo estudios en una gran variedad de productos cárnicos para determinar su vida media (Kant-Muermans y col., 1997; Neumeyer y col., 1997a, b; Devlieghere y col., 1999). Sin embargo, en estos estudios no se ha usado un modelo capaz de integrar todas las variables que pueden tener algún efecto en el crecimiento microbiano. Los principales factores que afectan la estabilidad microbiana en los productos cárnicos son la temperatura, pH y a_w . Particularmente la temperatura puede variar significativamente a través de la producción y distribución (Geeraerd y col., 1998). La mayoría de estudios han utilizado modelos dependientes de temperatura, como el modelo de raíz cuadrada, y si bien es cierto que en las mayorías de las carnes la temperatura es el principal factor que afecta a la vida media, no quiere decir que sea la

única variable (Einarsson y Erickson, 1986; Gill y Jones, 1992; Einarsson, 1994). Los modelos usados en la modelización predictiva de la vida media necesitan avanzar. Los métodos microbiológicos tradicionales de análisis, aunque son efectivos, son lentos. Las investigaciones futuras deberían tener en cuenta la corta vida media de muchas carnes refrigeradas, y el hecho de que los resultados se requieran con rapidez (Gibbs y Williams, 1990). Se requieren por lo tanto el uso de técnicas microbiológicas más rápidas.

3.1.6.2. Investigación y formulación de productos

Los modelos predictivos pueden ayudar en el desarrollo de nuevos productos, ya que las consecuencias microbiológicas derivadas de cambios en la composición o procesado de alimentos pueden ser evaluadas rápidamente. Se pueden hacer comparaciones entre las nuevas formulaciones y las antiguas y su repercusión sobre los posibles microorganismos presentes.

La alteración en la composición de un producto, o en el régimen de procesado, puede tener un efecto significativo en la población microbiana y/o en el crecimiento microbiano de microorganismos oportunistas. La MPA puede proporcionar una herramienta útil para evaluar rápidamente las consecuencias de cualquier cambio en la formulación o procesado.

3.1.6.3. Análisis de peligros y puntos críticos de control

La aceptación e implantación de programas de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) en la industria cárnica requiere una gran capacidad para tratar cuantitativamente con un rango de variables que influyen en la seguridad alimentaria (Buchanan y Whiting, 1996).

La modelización predictiva puede ayudar en análisis preliminares del peligro, identificación y establecimiento de puntos críticos de control y en la toma de acciones correctivas en la seguridad alimentaria. Las decisiones sobre si reprocesar, emplear rápidamente o desechar un alimento o ingrediente, pueden hacerse basándose en los modelos predictivos, en vez de esperar por los resultados del análisis microbiológico (Whiting y Buchanan, 2001).

Los modelos predictivos que están disponibles tienen un potencial para el desarrollo y mantenimiento de los sistemas APPCC (Elliot, 1996). Por lo tanto, una combinación de la microbiología predictiva y APPCC ofrece a la industria cárnica un acercamiento sistemático estructurado en el enfrentamiento de problemas, con cálculos cuantitativos cuando sea necesario (Zwietering y Hasting, 1997b). Por lo tanto la MPA puede ser considerada como una extensión del sistema APPCC (Roberts, 1989; McMeekin y col., 1992).

3.1.6.4. Estimación del riesgo

La estimación del riesgo es una herramienta analítica usada cada vez más para definir las prioridades a la hora de establecer una política de salud pública (Buchanan, 1995; Foegeding, 1997). El uso de la estimación del riesgo microbiano, en el área de la seguridad alimentaria, es una nueva disciplina emergente. Los modeladores necesitarán ser capaces de estimar la posibilidad de que el consumo de un alimento pueda ser causa de enfermedad, sin embargo, la estimación del riesgo no es una tarea fácil. La modelización del crecimiento e inactivación microbiana bajo condiciones fluctuantes, tales como temperatura, durante la producción, procesado, almacenamiento, distribución de la carne y productos cárnicos es complejo.

Para obtener información segura es necesario conocer la presencia y niveles de patógenos presentes, dosis infectiva, cinética de crecimiento de patógenos y cantidad de alimento consumido (Miller y col., 1998). La caracterización de la enfermedad, estimación dosis- respuesta y caracterización del riesgo podrían también ser ayudados con la microbiología predictiva (Walls y Scott, 1997).

Los modelos de estimación del riesgo, en la producción y procesado cárnico, tienen utilidad para ayudar a los productores, procesadores y a las organizaciones responsables de la inspección, a la hora de tomar decisiones críticas en la seguridad alimentaria que afecta a la sanidad pública (Oscar, 1997). Un ejemplo de esta aplicación son los modelos que han sido propuestos, como el de *S. aureus* en carnes cocidas (Walls y Scott, 1997), *L. monocytogenes* en albóndigas de carne (Miller y col., 1997), *E. coli* O157:H7 en hamburguesas de carne de vacuno (Cassin y col., 1998), *Salmonella* en alimentos cocidos mantenidos en refrigeración (Buchanan y Whiting, 1996) y carne de pollo cocida (Oscar, 1997; 1998).

La importancia de un adecuado programa de estimación de riesgo, dentro de los objetivos de calidad total de cualquier compañía, para alcanzar alta calidad, rentabilidad y seguridad, es particularmente relevante para los productores de la industria cárnica, mientras se respeten todos los requerimientos legales (Serra y col., 1999).

3.1.6.5. Educación

Los modelos pueden ayudar a explicar el comportamiento microbiano a personas no expertas en esta materia. Los gráficos de los tiempos necesarios para alcanzar un nivel de población crítico pueden demostrar claramente la importancia de los puntos críticos de control, o de la obtención de materias primas con bajos recuentos microbianos. Los modelos son especialmente útiles en la enseñanza de la microbiología de los alimentos, ya que ilustran rápidamente los efectos de las condiciones ambientales, particularmente en relación con el uso de tecnología de obstáculos múltiples.

El papel de la MPA en la educación técnica y no técnica de personas es el mismo. Aunque muchos técnicos deberían estar familiarizados con las respuestas de los microorganismos a los cambios ambientales, una visión clara de estos cambios a menudo puede reforzar el conocimiento que poseen y ayudarles para que su aplicación sea más productiva. Los modelos predictivos pueden ayudar a un productor en la creación de un programa APPCC más efectivo y sofisticado en el caso de un procesado de alimentos con muchas operaciones básicas (Whiting y Buchanan, 1994).

3.1.6.6. Otras aplicaciones

A escala de laboratorio los modelos pueden ser usados con rapidez para mostrar los rangos de interés para una determinada variable en estudio, y por lo tanto colaborar para un mejor diseño experimental. McMeekin y Ross, (1996a) aplicaron modelos predictivos, para describir el efecto de las variables ambientales en microorganismos inoculados deliberadamente en alimentos, incluyendo productos cárnicos, para producir el efecto deseado. Breidt y Fleming (1998) dirigieron una prueba de modelización del crecimiento competitivo de patógenos, como *L. monocytogenes* y un cultivo mixto bacteriano. Las investigaciones pueden ayudar en la selección de las bacterias ácido lácticas, para su uso como inhibidores competitivos de microorganismos patógenos, en

carnes fermentadas mínimamente procesadas. Pin y Baranyi (1998) usaron la microbiología predictiva para cuantificar los conceptos de dominio e influencia de los principales microorganismos alterantes encontrados en carnes refrigeradas almacenadas en ambiente aeróbico, bajo la influencia del pH y la temperatura.

Las técnicas de modelización se están convirtiendo en un utensilio de rutina para la representación y el análisis de datos microbiológicos. La eficacia en el laboratorio se ve aumentada cuando los modelos guían el diseño de protocolos experimentales. Los modelos pueden indicar la importancia de un factor, y si es necesario la comprobación exhaustiva con múltiples niveles y réplicas. Los modelos pueden sugerir los tiempos de muestreo adecuados y por lo tanto ahorrar recursos, tiempo y dinero.

3.1.7. Futuro de la microbiología predictiva

Es necesario incrementar las investigaciones de metabolitos para comprender la fisiología microbiana, de tal manera que los modelos primarios y secundarios se podrían usar como una plataforma para conocer las interacciones intrínsecas y extrínsecas fisiológicas, químicas y físicas de los microorganismos. Esto puede ayudar a incrementar los conocimientos de porqué ciertos microorganismos son más o menos tolerantes a las condiciones ambientales (Ko y col., 1994; Smith, 1996; Stecchini y col., 1998).

Se necesita poner un mayor énfasis en la modelización de la cinética de muerte de microorganismos patógenos, de esta manera se podrían diseñar modelos más efectivos, para incorporarlos en programas de APPCC y sistemas de estimación del riesgo en la producción cárnica.

La competencia entre microorganismos en los alimentos no está considerada en la mayoría de los modelos predictivos. El crecimiento de un patógeno en carne de vacuno, por ejemplo, es dependiente tanto de su densidad inicial de población como de los microorganismos competidores (Coleman y col., 1996). El crecimiento de microorganismos patógenos puede estar afectado por la producción de productos microbianos bacteriostáticos como las bacteriocinas. En Europa una bacteriocina purificada, la nisina, está preparada para su uso en algunos productos cárnicos para prevenir el crecimiento microbiano (McDonald, y Sun, 1999). Recientemente, se han

iniciado investigaciones dirigidas al desarrollado de modelos para predecir el efecto de crecimiento competitivo en patógenos (Breidt y Fleming, 1998; Pin y Baranyi, 1998).

Finalmente surge la necesidad de unir una serie de modelos, desde cada etapa en la cadena de procesado de un alimento, y desde aquí proporcionar un análisis de riesgo de la operación. Las investigaciones en estimación del riesgo se están continuando dentro de la comunidad científica. Sin embargo, la incertidumbre actual y falta de conocimientos sobre los efectos de operaciones particulares durante la producción, procesado y distribución de los alimentos ha significado que la aplicación práctica de la estimación del riesgo en la industria esté siendo limitada. Las investigaciones continúan integrando la estimación del riesgo y la MPA, y el análisis de una situación particular, podría ayudar en el aseguramiento de un proceso de producción.

El desarrollo de técnicas sofisticadas de conservación no térmicas en la industria cárnica, tales como procesado con alta presión hidrostática, procesado con pulsos eléctricos de alta densidad, procesado en campo magnético oscilante, esterilización con pulsos de luz y la irradiación de los alimentos, podría tener efectos significativos en la fisiología microbiana, las cuales afectarían a la capacidad para obtener predicciones seguras (Barbosa-Canovas y col., 1998). Como los modelos se mueven hacia aproximaciones más mecanicistas, tales como conectar el comportamiento de una sola célula, de tal manera que de una población completa se estén haciendo predicciones, se necesitan más variables (Baranyi, 1997). Sin embargo una sobre-parametrización puede hacer que los modelos sean innecesariamente complejos. Por ello los modelos deberían tener en consideración solamente aquellas variables que tienen un impacto significativo en las respuestas microbianas. Esto puede requerir mayor generación de modelos específicos de productos.

Debido a que los microorganismos patógenos crecen en la mayoría de alimentos, una cuestión importante que se plantea es dónde serán capaces de crecer hasta niveles significativos, antes de que la flora alterante cause el rechazo del alimento por parte del consumidor. Surge la necesidad de modelar sistemáticamente las respuestas de microorganismos alterantes representativos en modelos terciarios, que permitan dibujar curvas de crecimiento comparativas para microorganismos patógenos y alterantes. Para aquellos microorganismos patógenos con muy baja dosis infectiva o dosis tóxica, tales como *Listeria*, *Yersinia* y *Cl. botulinum* el criterio puede ser crecimiento o no

crecimiento y la flora alterante tiene escaso significado, a menos que alteren el ambiente por descenso de pH o producción de bacteriocinas.

3.2. *Leuconostoc mesenteroides*

3.2.1. Introducción

En el grupo microbiano de las bacterias ácido lácticas (BAL), está incluido *Leuconostoc mesenteroides*, microorganismo objeto de nuestro estudio. En la actualidad, el grupo de BAL está compuesto por 12 géneros de bacterias Gram positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Jay, 2000).

La historia del conocimiento de los estreptococos lácticos y su ecología fue revisada por Sandine y col. (1972), y señalan a la materia vegetal como el hábitat natural de este grupo. Además se ha sugerido que los estreptococos de las plantas pueden ser la comunidad ancestral a partir de la cual han evolucionado otras especies y cepas (Marth, 1974).

Aunque el grupo ácido láctico está definido con unos límites imprecisos, todos los representantes comparten la propiedad de producir ácido láctico a partir de hexosas, como la glucosa. Hacia 1920, Orla Jensen señaló que estas bacterias podían dividirse en dos grupos en función de los productos finales del metabolismo de la glucosa. Los que producen ácido láctico como principal o único producto de la fermentación se denominan homofermentativos (ruta de Embden- Meyerhof), mientras que los que producen cantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono y etanol son denominados heterofermentativos (ruta oxidativa de Pentosas Fosfato) (Stainer y col., 1992). Dentro de este último grupo destacamos tres géneros, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, cuyas características diferenciadoras de género y especie (morfología, condiciones de crecimiento, metabolismo, etc.) son recogidas en la Tabla 3 y 4.

Tabla 3. Características diferenciadoras de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.

CARACTERISTICAS	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
Morfología	Bacilos; cadenas cortas (a veces cocobacilos)	Cocos; en parejas o cadenas largas	Cocos; en parejas o cadenas (a veces bacilos cortos)
Gram	Gram +	Gram +	Gram +
Aerobio estricto	-	-	-
Anaerobio facultativo	+	+	+
Tª óptima crecimiento	30-40°C	30°C	20-30°C
pH óptimo	5.5-6.2	*	*
Colonias en agar	2-5 mm, convexas, sin pigmento	0.5-1.5 mm (en agar sangre)	± 1 mm, viscosas (en agar con sacarosa)
Catalasa	-	-	-
Formación de esporas	NO	NO	NO
Hemolítico	*	NO	NO
Indol	-	*	-
Motilidad	-	-	-
Oxidasa	*	-	*
Proteolítico	*	*	-
Reducción de nitratos	NO	*	NO
Formación de ácido láctico	D y L ácido láctico	L ácido láctico	D ácido láctico
Producción de gas	SI	NO	SI
Principales productos de fermentación de carbohidratos (anaerobiosis)	Lactato; algo de acetato, etanol, CO ₂	Lactato	Lactato, etanol
% Mol G+C de ADN	32-53	38-40	38-44
Crecimiento a:			
10°C	*	+	+
45°C	*	-	-
pH 9.6	*	-	ND
Crecimiento con:			
6.5% NaCl	*	-	B
40% bilis	*	D	ND
Hábitat	Lácteos, carne, pescado, vegetales	Lácteos y plantas	Lácteos, plantas y otros alimentos

+: ≥ 90% de las cepas son positivas; B: 11-89% de las cepas son positivas; -: ≥ 90% de las cepas son negativas; D: existen sustanciales diferencias entre especies; ND: no determinado; *: no descrito.

Tabla 4. Características diferenciadoras de las especies de *Leuconostoc*.

CARACTERÍSTICAS	<i>Leuc.</i> <i>amelibiosum</i>	<i>Leuc.</i> <i>carosum</i>	<i>Leuc.</i> <i>gelidum</i>	<i>Leuc.</i> <i>lactis</i>	<i>Leuc.</i> <i>paramesenteroides</i> .
Pigmento amarillo	-	-	-	-	-
Ácido desde:					
L-Arabinosa	+	-	+	-	B
Fructosa	+	+	+	+	+
Galactosa	*	*	*	+	+
Glucosa	*	*	*	+	+
Lactosa	*	*	*	+	(d)
Maltosa	+	-	C	+	+
Manitol	*	*	*	-	(d)
Sacarosa	+	+	+	+	+
Xylosa	*	*	*	-	B
Dextrano formado desde sacarosa	+	+	(+)	-	-
Factores crecimiento:					
Uracil	*	*	*	-	-
G+A+X+U	*	*	*	-	B
Riboflavina	*	*	*	+	+
P+AF	*	*	*	-	+
Crecimiento a:					
pH 4.8 (inicial)	ND	ND	ND	-	B
pH 6.5 (inicial)	*	*	*	+	+
Crecimiento con:					
3.0% NaCl	*	*	*	B	B
6.5% NaCl	*	*	*	-	B
10% etanol	ND	ND	ND	-	-
Crecimiento a 37°C	+	(-)	(-)	+	B
pH final en caldo glucosa	*	*	*	4.7	4.4

+: ≥ 90% de las cepas son positivas; (+): 80-89% de las cepas son positivas; B: 11-89% de las cepas son positivas; C: 21-79% de las cepas son positivas; (-): 11-20% de las cepas son positivas; -: ≥ 90% de las cepas son negativas; (d): reacción retrasada; ND: no determinado; *: no descrito; A: Adenina; AF: Ácido fólico; G: Guanina; P: Piridoxal; R: Riboflavina; U: Uracilo; X: Xantina.

Tabla 5. Características diferenciadoras de las subespecies de *Leuconostoc mesenteroides*.

CARACTERISTICAS	<i>L. mesenteroides</i> subsp.		
	<i>cremoris</i>	<i>dextranicum</i>	<i>mesenteroides</i>
Pigmento amarillo	(-)	-	-
Ácido desde:			
L-Arabinosa	-	-	+
Fructosa	-	+	+
Galactosa	B	B	+
Glucosa	+	+	+
Lactosa	+	+	(d)
Maltosa	B	+	+
Manitol	-	B	B
Sacarosa	-	+	+
Xylosa	-	B	B
Dextrano formado desde sacarosa	-	+	+
Factores crecimiento:			
Uracil	+	-	-
G+A+X+U	+	B	-
R+P+AF	+	B	B
Crecimiento a:			
pH 4.8 (inicial)	-	-	-
pH 6.5 (inicial)	+	+	+
Crecimiento con:			
3.0% NaCl	-	B	+
6.5% NaCl	-	-	B
10% etanol	-	-	-
Crecimiento a 37°C	-	+	B
pH final en caldo glucosa	5	4.5	4.5

+: $\geq 90\%$ de las cepas son positivas; (+): 80-89% de las cepas son positivas; B: 11-89% de las cepas son positivas; (-): 11-20% de las cepas son positivas; -: $\geq 90\%$ de las cepas son negativas; A: Adenina; AF: Ácido fólico; (d): reacción retrasada; G: Guanina; ND: no determinado; P: Piridoxal; R: Riboflavina; U: Uracilo; X: Xantina.

3.2.2. Características de *Leuconostoc mesenteroides*

El género *Leuconostoc*, está ampliamente distribuido en plantas, productos lácteos y otros productos alimenticios. No son patógenos para las plantas ni para los animales, incluido el hombre (Sneath y col., 1991).

Leuconostoc mesenteroides es un microorganismo Gram positivo, de morfología cocoide, anaerobio facultativo, no móvil y no formador de esporas. Otras características adicionales son recogidas en las Tablas 3 y 5.

3.2.2.1. Morfología

Generalmente *Leuconostoc mesenteroides* suele tener forma cocoide, presentándose en parejas o formando cadenas. Sin embargo, la morfología celular puede variar en función de las condiciones de crecimiento. Así, cuando el medio de cultivo es agar, las células presentan una apariencia esférica, mientras que cuando este microorganismo es cultivado en caldo, las células suelen tener forma bacilar, pudiéndose confundir con lactobacilos y formando largas cadenas. Las colonias normalmente son pequeñas, con un diámetro inferior a 1 mm, lisas, redondas y de un color blanco grisáceo. Diferentes tipos de colonias se pueden diferenciar cuando crecen sobre agar de sacarosa, dependiendo de la estructura química del tipo predominante de dextrano formado; sin embargo, no se ha demostrado que estas diferencias tengan valor taxonómico. Este compuesto es el responsable de la formación de limo en el sustrato de crecimiento, hecho que se ve favorecido cuando el desarrollo de este microorganismo se produce a una temperatura entre 20-25°C (Sneath y col., 1986).

3.2.2.2. Crecimiento y metabolismo

El microorganismo objeto de nuestro trabajo, *Leuconostoc mesenteroides*, se desarrolla en un rango de temperatura de 10-37°C, siendo la óptima 20-30°C. En cuanto a la velocidad de crecimiento, *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* presenta un tiempo de generación más corto que otras subespecies y un buen crecimiento puede ser obtenido en 24 horas a una temperatura de 30°C.

Cuando *L. mesenteroides* crece en medio de cultivo líquido es frecuente observar una importante y uniforme turbidez debido a la formación de largas cadenas celulares que tienden a sedimentar.

En cuanto a los requerimientos nutritivos es necesario un medio enriquecido para su crecimiento, que contenga factores de crecimiento y aminoácidos. De hecho, *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* precisa ácido glutámico y valina, y de forma adicional, entre el 11–86% de las cepas requieren riboflavina, piridoxal y ácido fólico para su crecimiento.

El crecimiento también es dependiente de la presencia de carbohidratos fermentables, como la lactosa, fructosa, sacarosa y la glucosa, que es fermentada por medio de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Los productos finales más importantes resultantes de la fermentación son el lactato, etanol, D (-) ácido láctico y CO₂. Normalmente los polisacáridos y los alcoholes no son fermentados (Sneath y col., 1991).

En general, la leche es un medio de cultivo pobre para *Leuconostoc*, aunque la mayoría de las cepas crecen cuando es suplementada con extracto de levadura y glucosa. Concretamente, *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* acidifica y coagula la leche con formación de gas, mientras que otras especies son menos activas (Sneath y col., 1991).

3.2.2.3. Cultivo y aislamiento

Los medios de cultivo empleados para el aislamiento, mantenimiento y cultivo de *L. mesenteroides* son variados, destacando entre ellos, el agar Mayeux (Mayeux y col., 1962) y el caldo y agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe, 1960). Éstos últimos son quizás los más frecuentemente utilizados en los distintos trabajos que investigan la presencia y niveles de BAL en los alimentos (Holley y col., 1996; Zhang y Holley, 1999; Gill y Holley, 2000; Lee y col., 2000; Samelis y col., 2000a, b; Champagne y Gardner, 2002; Kalchayanand y col., 2002; Muyanja y col., 2002). Tanto el caldo como el agar MRS presentan en su composición magnesio, manganeso, acetato y polisorbato, que facilitan en gran medida el crecimiento de las BAL. Además, la calidad de las peptonas y los suplementos de extractos de carne y levadura, proporcionan los factores

de crecimiento necesarios que hacen que este medio sea uno de los más completos e ideales para el cultivo de estos microorganismos.

3.2.3. Papel de *Leuconostoc mesenteroides* en la alteración de alimentos

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son consideradas como los principales microorganismos responsables del deterioro de productos cárnicos cocidos envasados. Estas bacterias intervienen en los procesos de alteración de los alimentos por la fermentación de los azúcares, formando ácido láctico, limo y CO₂, que desencadenan en la caída del pH y en la aparición de olores y sabores extraños. Este hecho afectaría a sus atributos sensoriales y al grado de aceptación del producto (Huis in't Veld, 1996) provocando importantes pérdidas económicas en las industrias alimentarias. Dentro de este grupo de BAL, *Leuconostoc mesenteroides* ha sido frecuentemente aislado como microorganismo responsable de alteración en diversos tipos de productos cárnicos tales como jamón cocido, salami, productos curados, salchichas cocidas tipo viena y frankfurt etc. (Korkeala y col., 1988; Holley y col., 1996; Björkroth y col., 1998; Samelis y col., 1998; Zhang and Holley, 1999) y concretamente, la subespecie *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* ha sido aislada (Korkela y Mäkelä, 1989; Mäkelä y col., 1992a, b, c; Mäkelä, 1993; Dykes y col., 1994a, b; Björkroth y Korkeala, 1996b; Huis in't Veld, 1996; Susiluoto y col., 2003).

3.3. Productos cárnicos cocidos

3.3.1. Introducción

Los productos cárnicos cocidos curados son aquellos que incluyen en su procesado la adición de sales de curado así como un tratamiento térmico de pasterización. Entre estos productos destacan algunos como el paté, el jamón cocido, emulsiones cárnicas, etc., que son distribuidos en refrigeración y normalmente no precisan un tratamiento térmico antes de su consumo.

Las sales de curado utilizadas con mayor frecuencia son cloruro sódico, nitratos y nitritos, que pueden ser añadidos a la carne mediante salmuera, por inyección o inmersión) así como mediante mezcla durante la preparación de la emulsión cárnica.

Otros ingredientes o aditivos que a menudo se adicionan son lactato sódico, ascorbato, fosfato, especias, etc.

La pasterización de los productos crudos se realiza a continuación a una temperatura entre 65-75°C por medio de vapor o agua caliente como medio de transferencia de calor. Los productos cárnicos pueden ser distribuidos en los envases definitivos en los que recibieron el tratamiento térmico o bien pueden ser reenvasados después de la pasterización. En este último caso la manipulación debe realizarse en condiciones de máxima higiene ya que existe riesgo de contaminación por microorganismos patógenos, pudiendo producir enfermedades por el consumo del alimento, o por microorganismos alterantes, limitando el periodo de vida comercial de estos productos.

Actualmente en la industria cárnica se está imponiendo el envasado a vacío o atmósferas modificadas para los productos cocidos, lo cual presenta entre otras ventajas el incremento del periodo comercial y la mejora de calidad en la conservación y distribución del alimento.

3.3.2. Alteración de productos cárnicos cocidos envasados

Desde el punto de vista comercial, la alteración de los alimentos puede ser considerada como cualquier cambio que hace que un producto no sea aceptado por el consumidor (Hayes, 1985). Las alteraciones conllevan grandes pérdidas económicas para las industrias alimentarias, de ahí que sea fundamental la aplicación de modernas tecnologías para conseguir productos de gran calidad, controlando todas las fases, desde la calidad de las materias primas, pasando por la elaboración, distribución, hasta el momento de su consumo. Estas alteraciones pueden ser obvias en algunos casos (daños físicos, crecimiento visible de mohos, aparición de colores y olores extraños); sin embargo, son más difíciles de detectar a simple vista cuando las alteraciones son debidas a reacciones bioquímicas y/o microbiológicas que desencadenan cambios de textura, pérdida de sabor, formación de metabolitos, toxinas, etc. Por lo tanto, es muy importante evaluar la calidad del alimento realizando tanto análisis microbiológicos como bioquímicos y sensoriales.

Entre las reacciones bioquímicas destacan los cambios en el color (como es la decoloración y el pardeamiento) y la aparición de olores y sabores extraños (por

ejemplo, la rancidez) debido a los procesos de oxidación, lipólisis, irradiación, calor, etc. Son importantes los estudios de las interacciones existentes entre las reacciones bioquímicas y microbiológicas para así tener un mejor y más completo conocimiento de los mecanismos de alteración de los alimentos (Huis in't Veld, 1996).

La determinación de la calidad de un alimento también se debe enfocar desde el punto de vista sensorial de forma conjunta al análisis microbiológico. De hecho, la evaluación sensorial es una herramienta muy importante que cada vez con más frecuencia se está imponiendo en los distintos sectores de la industria alimentaria (investigación científica, estudio de mercados, desarrollo de nuevos productos, etc.).

3.3.2.1. Microorganismos alterantes

La alteración de los alimentos está principalmente causada por microorganismos psicrotrofos, levaduras y mohos. En el caso concreto de la carne y productos cárnicos, estos gérmenes son responsables de la producción de sustancias de mal olor, como acetoina, ácido acético, butírico, isobutírico, isovalérico, etc., afectando al grado de aceptación del alimento (Dainty y col., 1979; Dainty y Hibbard, 1980). Entre los microorganismos que intervienen en la alteración de productos cárnicos se han señalado, entre otros, *Brochothrix thermosphacta* y bacterias ácido lácticas (Dainty y Mackey, 1992; Dykes y col., 1994a; García de Fernando y col., 1995; Borch y col., 1996; Garriga y col., 1996; Huis in't Veld, 1996; Korkeala y Björkroth, 1997).

Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas son consideradas como los principales microorganismos responsables de los procesos de alteración de productos cárnicos. Entre éstas, caben destacar las especies *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus* como el principal grupo alterante en productos cárnicos cocidos envasados en atmósfera anaeróbica (Reuter, 1970; Mol y col., 1971; Holzapfel y Gerber, 1986; Borch y Molin, 1989; Korkeala y Mäkelä, 1989; von Holy y col., 1991; Dykes y col., 1994 a; Devlieghere y col., 1998). Además destacan lactobacilos heterofermentativos y leuconostocs en productos cárnicos cocidos envasados al vacío (Borch y col., 1988; Borch y Molin, 1988; Borch y Nerbrink, 1989; Korkeala y Mäkelä, 1989; von Holy y col., 1991; Mäkelä y col., 1992a, b, c; Dykes y von Holy, 1993; Dykes y col., 1994a;

Dykes y von Holy, 1994; Dykes y col., 1995; Björkroth y col., 1998; Samelis y col., 1998). En ciertas ocasiones puede ocurrir que algunos de estos microorganismos que inicialmente tienen una función protectora, secundariamente produzcan metabolitos finales, debido a la degradación de carbohidratos fácilmente fermentables por este tipo de bacterias, que son organolépticamente indeseables y afectan a la vida media del producto (Schillinger y Lücke, 1987; Korkeala y Mäkelä, 1989; Holzapfel, 1992).

Durante el procesado, el número de bacterias ácido lácticas (BAL) en la superficie de los productos cárnicos es generalmente muy baja inmediatamente después del tratamiento térmico (Mäkelä y Korkeala, 1987). Sin embargo existen algunas cepas de BAL termotolerantes o termorresistentes, como *Weisella viridescens*, que pueden sobrevivir debido a una cocción insuficiente, y esto conlleva una alteración del producto más prematura.

Después del tratamiento térmico los productos son enfriados por medio de agua o aire frío. Aquellos productos tratados en su envase definitivo podrán contener microorganismos que hayan sobrevivido proceso térmico; no obstante, la contaminación presente en los productos que sufren un procesado posterior a la cocción se producirá durante la manipulación, loncheado y envasado (Roberts y col., 1998).

Se han realizado diversos estudios con el fin de determinar el origen y tipo de microorganismos alterantes de productos cárnicos a lo largo de la línea de producción, como el desarrollado por Samelis y col. (1998) en jamón cocido envasado al vacío. Los resultados mostraron a *Lactobacillus sake* y *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* como los principales microorganismos responsables de la alteración a 4°C y 12°C, debido a la recontaminación en la sala de loncheado. En estos casos las BAL son transmitidas por el aire, siendo las principales fuentes de contaminación los manipuladores y las superficies de trabajo en contacto con los alimentos.

Otras investigaciones, que utilizaron patrones de restricción de genes (rRNA) y fueron realizadas con productos cárnicos en piezas y loncheados al vacío, revelaron que las materias primas cárnicas crudas eran una importante fuente de contaminación en las plantas de procesado (Björkroth y Korkeala, 1996a, b). Mediante la técnica de electroforesis en gel (Pulsed Field Gel Electrophoresis-characterisation, PFGE), Björkroth y col. (1998) determinaron también que la carne cruda era el origen de

contaminación en jamón cocido, destacando *Leuconostoc carnosum* como microorganismo alterante.

Otro tipo de contaminación que se puede producir es la llamada contaminación cruzada, como pudo ser demostrado por Björkroth y Korkeala (1996a) al aislar, en productos cárnicos cocidos alterados, el microorganismo iniciador (“starter”, *Lactobacillus sake*) de productos cárnicos fermentados, cuando ambos productos fueron manipulados en la misma sala.

Brochothrix thermosphacta

Este microorganismo puede tener también un papel importante en la alteración de los productos cárnicos envasados al vacío (Gill y Badoni, 2002; Sakala y col., 2002; Samelis y Georgiadou, 2000; Sorheim y col., 1999; Samelis y col., 1998; Jones, 1991). No es competitivo bajo condiciones de anaerobiosis y su crecimiento decrece rápidamente en presencia de lactobacilos (especialmente *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus curvatus*) en carnes y productos cárnicos refrigerados envasados al vacío (Stiles y Holzapfel, 1997; Collins-Thompson y Rodríguez-López, 1982). Bajo anaerobiosis, *B. thermosphacta* produce ácido láctico a partir de la glucosa, así como pequeñas cantidades de etanol y ácido fórmico (Blickstad y Molin, 1984).

3.3.2.2. Tipos de alteración microbiológica

Los microorganismos alterantes de los productos cárnicos cocidos envasados al vacío son responsables de cambios sensoriales y cambios en la apariencia física del alimento (Korkeala y Björkroth, 1997). El deterioro puede manifestarse como agriado, alteración del olor y sabor, decoloración, acumulación de gas, exceso de exudado y presencia de limo o viscosidad en la superficie.

Agriado y alteración del olor y sabor

Las BAL en ambientes anaeróbicos son generalmente los principales microorganismos responsables de la formación de ácido láctico, ácido acético y pequeñas cantidades de otros ácidos orgánicos (Holzapfel, 1998), todos ellos producidos durante la fase de crecimiento logarítmico y sobre todo en la fase estacionaria (Kempton y Bobier, 1970; Korkeala y col., 1989; von Holy y col., 1991)

De forma adicional pueden incrementar la producción de D(-) y L(+) ácido láctico cuando se supera el nivel de 10^7 unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) en la superficie de productos cocidos envasados al vacío (Korkeala y col., 1990). Normalmente el ácido láctico como tal no produce olores extraños fuertes; sin embargo, en altas concentraciones su producción suele estar acompañada por la formación de metabolitos finales, en parte volátiles, como ácidos grasos de cadena corta (ácido acético y butírico) (Dainty, 1982). Los valores de sabor y aroma determinados mediante análisis sensorial mostraron que pueden decrecer rápidamente desde una valoración constante cuando el recuento de lactobacilos superó 1.4×10^7 ufc/g en salchichas cocidas envasadas al vacío (Korkeala y col., 1989); además las muestras cárnicas son consideradas como alteradas cuando la cantidad de ácido láctico excede de 3-4 mg/g ($\text{pH} < 5.8$).

Brochothrix thermosphacta también ha sido identificado como responsable de alteración en productos cárnicos cocidos, desarrollando características sensoriales distintas a las que desencadenan las BAL. En el estudio llevado a cabo por Penney y col. (1993) se identifican a lactobacilos como responsables de sabores “ligeramente ácidos”, mientras que *B. thermosphacta* es asociado a olores y sabores a “sudor”.

Alteración del color

La mayor parte de las alteraciones en el color de los productos cárnicos se deben al metabolismo de la mioglobina de la carne en sus distintas formas químicas. Uno de los deterioros más importantes es la aparición del color verde, a menudo en forma de puntos, causado por la oxidación de la nitrosomioglobina a colemioglobina por acción del peróxido de hidrógeno (Holzapfel, 1998). Existen algunas bacterias, como *Weissella viridescens*, *Carnobacterium divergens* y *Lactobacillus brevis/buchneri*, que son capaces de producir H_2O_2 , y, si la enzima catalasa en la carne ha sido destruida por acción del tratamiento térmico o presencia de nitrito, sucede que este compuesto se puede acumular e interviene en la conversión de la mioglobina, produciendo el color verde (Egan, 1983; Cantoni y col., 1992). Otra alteración es la aparición de una coloración verdosa en la superficie que suele estar asociada con *Lactobacillus* y *Leuconostoc* homo y heterofermentativos, *Weissella* sp., *C. divergens*, *Enterococcus* sp.

y *Pediococcus sp.* como consecuencia de una recontaminación del producto después de la cocción (Grant y col., 1988; Borch y Molin, 1989).

Producción de gas

Durante el almacenamiento de los productos cárnicos envasados al vacío se puede observar un incremento en la concentración de CO₂, atribuido al metabolismo de las bacterias heterofermentativas. Aunque la formación de CO₂ está principalmente asociada con el crecimiento de distintas especies de *Leuconostoc* (*L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, *L. carnosum* y *L. amelibiosum*), otros lactobacilos y *Weissella sp.* también pueden contribuir a la producción de este gas en los envases de los productos cárnicos (Korkeala y col., 1987; Korkeala y Lindroth, 1987; Ahvenainen y col., 1990; von Holy, 1991; Mäkelä y col., 1992c; Dykes y col., 1994a).

Exceso de exudado

En algunos productos cárnicos cocidos envasados al vacío en ocasiones se puede observar una excesiva separación de exudado, que suele ir acompañado de olor agrio y crecimiento prolífico de bacterias ácido lácticas (von Holy y col., 1991).

Formación de limo o viscosidad

Esta alteración, debida principalmente a la formación de exopolisacáridos, es causada por diferentes bacterias ácido lácticas, especialmente *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, *L. mesenteroides subsp. dextranicum*, *L. gelidum* y *L. amelibiosum* (Korkeala y col., 1988; von Holy y col., 1991; Mäkelä y col., 1992a, b, c; Mäkelä, 1993; Dykes y col., 1994b; Björkroth y Korkeala, 1996b). Las bacterias productoras de limo no sobreviven a un tratamiento térmico de 68°C como temperatura interna (Mäkelä y col., 1992b), por tanto su presencia se debe a una contaminación posterior durante el enfriamiento, manipulación, loncheado y/o envasado (Mäkelä y col., 1992b, c). El limo o viscosidad a menudo aparece antes de la fecha de caducidad del producto, cuando las bacterias están todavía en la fase logarítmica de crecimiento y antes de que el valor del pH haya descendido (Korkeala y Björkroth, 1997).

3.3.3. Microorganismos patógenos

Los microorganismos patógenos pueden estar presentes en los productos cárnicos cocidos debido a la resistencia al tratamiento térmico o a una posterior contaminación cruzada o por manipulación. *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* son importantes microorganismos causantes de enfermedad (Todd, 1997; Kohl y Farley, 2000; Little y de Louvois, 1998; Roberts y col., 1998), así como *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* (Kramer y Gilbert, 1989; Regan y col., 1995). Sin embargo, teniendo en cuenta que la temperatura de almacenamiento de los productos cárnicos cocidos es inferior a 7°C, sólo son capaces de crecer a estas temperaturas los microorganismos patógenos psicrotrofos, entre los que destacan *Clostridium botulinum* no proteolítico, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Aeromonas sp.*

Clostridium botulinum no proteolítico (tipos B, E y F) produce una toxina extremadamente poderosa y el consumo de alimentos en los que este microorganismo ha crecido puede producir enfermedad o incluso la muerte (Fernández y Peck, 1997). Entre estos alimentos se encuentran productos tanto de origen vegetal como animal (Rhodehamel y col., 1992; Dodds, 1993). Aunque las esporas son inactivadas cuando el tratamiento térmico se realiza a una temperatura de 100°C, éstas pueden sobrevivir con un tratamiento medio aplicado en la producción de productos cárnicos cocidos (Lund y Peck, 1994).

Aunque la mayor parte de los casos de listeriosis provocados por *Listeria monocytogenes* han sido asociados a leche cruda y sus derivados (Bille, 1989), los productos cárnicos también han estado implicados en numerosas ocasiones, como es el caso de paté, salchichas, pavo cocido, jamón curado, etc. (Beumer y col., 1996; Nichols y col., 1998; Barakat y Harris, 1999; Uyttendaele y col., 1999; Frye y col., 2002).

Yersinia enterocolitica se encuentra ampliamente distribuido en variedad de animales, alimentos y agua. Además, el cerdo es considerado como el principal reservorio de los bioserotipos patógenos para el hombre (Roberts y col., 1996). Numerosos estudios han demostrado la presencia de este microorganismo en productos cárnicos, como ternera cocida, paté de pollo y carne de ave cocida (Hudson y Mott, 1993; Logue y col., 1996; Barakat y Harris, 1999).

Aeromonas sp. ha sido reconocido como un microorganismo patógeno de una importancia comercial y clínica en aumento, si bien no está clara la capacidad para producir exotoxinas a bajas temperaturas en los alimentos. *Aeromonas* tiene una alta incidencia en diversos productos alimentarios, como vegetales, pescado (Davies y Slade, 1995; Jacxsens y col., 1999) así como productos cárnicos cocidos (Hudson y De Lacy, 1991; Hunter y col., 1992; Gobat y Jemmi, 1993; Soriano y col., 2000).

Debido a que todos estos microorganismos patógenos son psicrotrofos, y por tanto, capaces de crecer a temperaturas de refrigeración a las que se almacenan los productos cárnicos y otros alimentos, se hace necesario combinar el frío con el empleo de conservantes como cloruro sódico, nitrito sódico, lactato sódico, etc., para de este modo, controlar el crecimiento y desarrollo de los patógenos.

3.3.4. Conservantes de productos cárnicos cocidos

En sus comienzos, la técnica del curado se desarrolló para conservar algunos alimentos mediante la adición de cloruro sódico. Se vio que el nitrato sódico (una impureza de la sal) era responsable de la aparición del pigmento rosa rojizo de la carne, el llamado color de carne curada. Más tarde, se comprobó que el compuesto responsable de la aparición del color era el nitrito y no el nitrato que se originaba por reducción bacteriana del anterior. En la actualidad se consideran sales de curado al cloruro sódico y al nitrito o nitrato de sodio o de potasio.

3.3.4.1. Cloruro sódico

El cloruro sódico (NaCl) actúa sobre los microorganismos inhibiendo o retardando su crecimiento, si bien debe encontrarse en altas concentraciones. El NaCl disminuye la actividad agua (a_w) de los productos cárnicos, pudiendo ser descrito como un “agente químico secante”. Además reduce la solubilidad del oxígeno en agua, lo cual puede explicar la mayor inhibición de los microorganismos aerobios cuando el NaCl es empleado para disminuir la a_w (Lubieniecki-von Schelhorn, 1975).

Así pues, el cloruro sódico es un importante agente conservador que prolonga la vida comercial de los productos cárnicos, sin embargo, las preferencias de los consumidores por productos con bajo contenido en sal ha hecho reducir la cantidad añadida por debajo del 3%. Esto hace necesario el empleo de otros tratamientos

adicionales, como la refrigeración y la adición de lactato para completar la acción bacteriostática.

3.3.4.2. Nitritos

En los productos cárnicos cocidos los nitratos y nitritos tienen un papel fundamental en la obtención final del aroma, sabor y sobre todo color. La adición de nitrito a la carne transforma los pigmentos cárnicos, en especial la mioglobina y en menor medida la hemoglobina, en un pigmento rojo, insoluble en agua, el óxido nítrico mioglobina. El calentamiento transforma este pigmento en otro rosa, el nitrosil-hemocromo que se estabiliza con los ascorbatos. La reacción del curado es acelerada por un pH bajo, condiciones reductoras y altas temperaturas; de esta forma, en condiciones óptimas, la adición de 15 ppm de nitrito sódico produce el máximo color en los productos picados y emulsionados y unas 50 ppm dan el máximo color al jamón.

Estas sales de curado tienen otra función importante actuando como agentes antimicrobianos o bacteriostáticos. A las concentraciones y condiciones frecuentemente utilizadas, los agentes del curado no causan una destrucción microbiana rápida; más bien retrasan o previenen el desarrollo de los microorganismos, tanto patógenos como alterantes. El mecanismo de acción de los nitratos y nitritos se basa en la formación, a partir de estos, de ácido nitroso y óxidos de nitrógeno, que actúan sobre los grupos amino del sistema deshidrogenasa de las células microbianas produciéndose la acción inhibitoria (Quastel y Woolridge, citado por Lück y Jager, 1997). Otra importante forma de inhibición es la acción específica sobre las enzimas bacterianas responsables del catabolismo microbiano de la glucosa (Woods y col., 1981; Woods y Wood, 1982).

El empleo de nitratos y nitritos en productos cárnicos está suscitando en los últimos tiempos opiniones encontradas, debido al posible efecto negativo sobre la salud por inducción de cáncer. Esto es atribuido al hecho de que los nitritos al reaccionar con las aminas secundarias, procedentes de la degradación de proteínas y aminoácidos, dan lugar a nitrosaminas con potencial cancerígeno cuya formación no puede ser totalmente prevenida en los alimentos y en el organismo (Janssen, 1997). Sin embargo, existen buenos inhibidores de la nitrosaminación, como es el ácido ascórbico, añadido como aditivo o ingrediente adyuvante, el cual reacciona rápidamente con el nitrito formando

óxido nítrico y ácido dehidroascórbico; de esta forma se puede inhibir la formación de dimetilnitrosamina en más de un 90% (Janssen, 1997).

3.3.4.3. Lactato sódico

En los últimos años el lactato sódico, debido a su poder antimicrobiano, se ha sugerido como una posible alternativa al empleo de los nitritos en productos cárnicos (Miller y col., 1993; Shelef, 1994; Lamers, 1996). Diversas investigaciones se han centrado en el estudio del efecto de este compuesto sobre microorganismos patógenos (Lamers, 1996; Barakat y Harris, 1999; Devlieghere y col., 2001) y alterantes, como BAL (de Wit y Rombouts, 1990; Houtsma y col., 1993; Devlieghere y col., 2000), dando lugar a un retraso en la alteración de los productos cárnicos cocidos envasados anaeróbicamente o a vacío (Papadopulos y col., 1991; Brewer y col., 1993; Bloukas y col., 1997).

3.3.4.4. Polifosfatos

La función fundamental de estos compuestos es incrementar la capacidad de retención de las proteínas cárnicas, influyendo en la calidad de las emulsiones y características sensoriales (Goutefongea, 1992). De forma adicional tienen actividad antimicrobiana debido a su capacidad quelante (Davidson y Juneja, 1990; Lee y col., 1994), capacidad que pierden con el tratamiento térmico (Jen y Shelef, 1986).

3.3.5. Envasado de productos cárnicos

Hoy en día los consumidores demandan alimentos seguros, sanos y de alta calidad, lo que ha provocado en las industrias una búsqueda y avance en las tecnologías alimentarias. En este contexto se produce el desarrollo del envasado en atmósferas modificadas de los alimentos como complemento a la conservación de los alimentos en refrigeración.

La vida útil de alimentos perecederos, como productos cárnicos, pesqueros, frutas, vegetales, etc., conservados en atmósfera normal se ve limitada debido al efecto del oxígeno y al crecimiento de microorganismos aerobios alterantes. El almacenamiento en refrigeración podría retrasar la aparición de cambios sensoriales indeseables (alteración de olor, sabor, color y textura) pero no prolongaría la vida útil

del producto el tiempo suficiente requerido para su distribución y comercialización. De ahí surge la necesidad de eliminar el oxígeno o modificar la atmósfera gaseosa de envasado de los productos alimentarios, con el objetivo de mantener las características organolépticas del producto y alargar la vida útil sin añadir aditivos ni conservantes (Parry, 1995), al disminuir la tasa respiratoria, limitar el crecimiento microbiano y retardar las reacciones enzimáticas (Young y col., 1988).

Las potenciales ventajas e inconvenientes del envasado en atmósferas modificadas han sido presentadas por Farber (1991) y Parry (1993) y resumidas por Davies (1995):

Ventajas

- Incremento de la vida útil entre 50-400%
- Reducción de las pérdidas económicas (retraso de la alteración)
- Comercialización y distribución de los alimentos a grandes distancias
- Mejora de la calidad final del producto
- Mayor facilidad de separación de los productos loncheados
- Mejora de la presentación
- Reducción o ausencia en la adición de conservantes químicos

Inconvenientes

- Incremento del coste de producción y manufactura
- Control de temperatura
- Uso de diferentes gases o sus mezclas para cada tipo de producto
- Empleo de maquinaria y equipos específicos
- Pérdida de los beneficios del envasado una vez abierto o roto el envase

3.3.5.1. Tipos de envasado de productos cárnicos

El envasado en atmósferas modificadas supone la evacuación del aire del envase y que posteriormente es sustituido por un gas o mezcla de gases (principalmente CO₂, N₂ y O₂), dependiendo de la naturaleza del alimento. La atmósfera gaseosa cambia en el interior del envase continuamente a lo largo del periodo de almacenamiento, debido a factores como el metabolismo respiratorio del alimento y de microorganismos, procesos bioquímicos y la permeabilidad de gases a través de la película de envasado (Parry, 1995).

A pesar del gran número de estudios realizados sobre los efectos del CO₂ sobre el crecimiento y metabolismo microbiano, aun no están claros los mecanismos de inhibición de este gas (Day, 2000). Se han propuesto diversos mecanismos de acción que en función de su efecto provocarían: el descenso del pH del alimento; la penetración del CO₂ en la célula seguido por el descenso del pH citoplasmático microbiano; acciones específicas sobre enzimas citoplasmáticas; y alteración de las propiedades de las membranas celulares (Jones, 1989; Dixon y Kell, 1989).

Como consecuencia del empleo de este gas se produce, en el ámbito microbiano, un incremento de la fase de latencia y del tiempo de generación. El efecto inhibitor del CO₂ varía con el tipo de microorganismo y por ello las bacterias psicrotrofas aerobias Gram negativas y los mohos son especialmente sensibles, mientras que las bacterias lácticas, las enterobacterias, *Brochothrix thermosphacta* y las levaduras lo son menos. Asimismo es crucial en la inhibición la fase de crecimiento en que se encuentren los microorganismos, ya que cuando la aplicación del CO₂ es posterior a la fase de latencia su efectividad disminuye (Stiles, 1991). Otros factores que también influyen en su efecto son la concentración gaseosa, la actividad agua del medio así como la temperatura de almacenamiento, ya que a medida que disminuye la temperatura aumenta la solubilidad del CO₂ y con ello su efecto bacteriostático (Parry, 1995).

El envasado a vacío puede considerarse como un tipo de atmósfera modificada, en el que tras envasar el alimento en recipientes de baja permeabilidad, el aire es eliminado por medio de vacío y se realiza un sellado hermético de los envases (García y col., 1995). En la carne y productos cárnicos envasados al vacío el oxígeno residual (aproximadamente un 1%) se consume rápidamente, debido al crecimiento microbiano y a la respiración muscular, alcanzándose al cabo de unos días niveles de CO₂ del orden

del 10-30% (Waites, 1988; Parry, 1995). Por tanto se puede considerar a este tipo de envasado como una atmósfera enriquecida en CO₂.

Por último, en el envasado en atmósferas controladas el producto está expuesto de forma continua y controlada a una composición gaseosa determinada y regulada, que compensa los cambios naturales que produce la respiración del alimento y la permeabilidad del envase (Parry, 1995).

3.3.5.2. Efecto del envasado sobre los microorganismos

Los gases más comúnmente utilizados en el envasado de la carne y productos cárnicos son el N₂, O₂ y CO₂, individualmente o en forma de mezclas en distintos porcentajes; las combinaciones más frecuentes son CO₂/N₂, O₂/CO₂/N₂ y CO₂/O₂, dependiendo de múltiples factores como tipo de producto (contenido graso, humedad, flora microbiana, etc.), material de envasado y temperatura de almacenamiento.

El nitrógeno es un gas inerte usado en el envasado en atmósferas modificadas para desplazar al oxígeno así como retrasar la oxidación y prevenir la rancidez de los alimentos. También puede indirectamente retardar el crecimiento de microorganismos aerobios alterantes en productos perecederos.

El oxígeno es utilizado en el envasado de carnes frescas para formar oximioglobina, la cual es responsable del color rojo brillante de este tipo de productos, siendo empleado generalmente en combinación con CO₂ y N₂. Es muy importante utilizar los niveles adecuados de O₂, ya que altas concentraciones pueden provocar rancidez oxidativa en ciertos productos sensibles al oxígeno y favorecer el desarrollo de la microflora alterante (Goodburn y Halligan, 1988); sin embargo, niveles excesivamente bajos (0.5-1%) pueden inducir a la formación de colores oscuros en productos cárnicos sin curar (Egan y col., 1988) o verdosos en productos con débil tratamiento térmico (Trout, 1991).

El dióxido de carbono influye en el crecimiento microbiano provocando un incremento de la fase de latencia y del tiempo de generación. El efecto inhibitor del CO₂ varía con el tipo de microorganismo y por ello son especialmente sensibles las bacterias psicotrofas aerobias (*Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, etc.) y los mohos. Sin embargo las bacterias ácido lácticas, las enterobacterias, *Brochothrix*

thermosphacta y las levaduras lo son menos. Asimismo, en la inhibición inducida por este gas, es crucial la fase de crecimiento en que se encuentren los microorganismos, ya que cuando la aplicación del CO₂ es posterior a la fase de latencia su efectividad disminuye (Stiles, 1991). Otros factores que también influyen en su efecto son la concentración gaseosa, la actividad agua del medio así como la temperatura de almacenamiento, ya que a medida que disminuye la temperatura aumenta la solubilidad del CO₂ y con ello su efecto bacteriostático (Zhao y col., 1994; Parry, 1995).

3.3.6. Análisis sensorial

3.3.6.1. Evolución histórica

El hombre, a lo largo de los siglos y en el transcurso de su evolución, ha confiado en sus sentidos y experiencias para seleccionar los alimentos que ha necesitado, y ello le ha permitido diferenciar los alimentos saludables de los que no lo eran. Sin embargo, el reconocimiento del análisis sensorial como una disciplina científica ha sido tardío. En la industria alimentaria, otros estudios, como composición química y microbiológica y características físicas, precedieron a los estudios sensoriales como instrumento ordinario para determinar la calidad de los alimentos (Ibáñez y Barcina, 2001).

Los primeros pasos de la evaluación sensorial y su aplicación para determinar la aceptación de los alimentos se dieron a comienzos del siglo XX, si bien en el sector no existía un consenso sobre la función que debía desempeñar esta ciencia emergente. En la industria alimentaria tradicionalmente el análisis sensorial era llevado a cabo por el llamado “experto” de la compañía, persona que por la experiencia acumulada es capaz de tomar decisiones referentes a la materia prima, elaboración y comercialización, incidiendo en la calidad final del producto (Ibáñez y Barcina, 2001). Sin embargo, con la llegada de la moderna evaluación sensorial estas individualidades fueron reemplazadas por un conjunto de personas entrenadas que realizan análisis de los alimentos con metodologías específicas en el contexto de experiencias planificadas (Torre- Hernández, 2000).

A partir de finales de los años 30, simultáneamente al desarrollo de técnicas analíticas sofisticadas, se iniciaron las investigaciones sobre el flavor de los alimentos.

A raíz de la Segunda Guerra Mundial, los estudios e interés sobre la evaluación sensorial y la aceptabilidad de los alimentos aumentaron enormemente siendo los laboratorios de las fuerzas armadas norteamericanas pioneros en este avance. El motivo desencadenante fue el hecho de que las raciones de los soldados norteamericanos, aunque eran correctas desde el punto de vista nutricional, eran rechazadas porque carecían de unas cualidades que las hicieran apetecibles. En las décadas de los 60 y 70 continuaron los trabajos de investigación, no exentos de numerosas dificultades (Ibáñez y Barcina, 2001).

Desde entonces y hasta hoy en día el análisis sensorial se ha desarrollado rápidamente, a pesar de que en un principio se dudara de su fiabilidad como medida de calidad, debido a la subjetividad asociada al ser humano que realiza la valoración sensorial. Sin embargo, esta subjetividad queda contrarrestada mediante el entrenamiento de los órganos de los sentidos para obtener respuestas objetivas (Ibáñez y Barcina, 2001).

Hoy en día no cabe duda de que la evaluación sensorial tiene el carácter de ciencia, con un aceptable grado de precisión y reproductibilidad y es utilizada como una importante herramienta para estudiar y traducir los deseos y las preferencias de los consumidores en propiedades tangibles y bien definidas de un producto dado (Torre-Hernández, 2000; Ibáñez y Barcina, 2001).

3.3.6.2. Concepto de análisis sensorial y definiciones

La evaluación de los alimentos es una función básica y primaria del ser humano. Desde que somos niños, aceptamos o rechazamos los alimentos de una forma consciente en función de la sensación que nos provocan, estableciendo entonces unos criterios que nos llevan a elegir unos u otros alimentos. La evaluación de la calidad sensorial, como una parte de la calidad global del alimento, es realizada mediante una disciplina científica, el análisis sensorial, cuyo instrumento de medida es el propio hombre. (Ibáñez y Barcina, 2001)

Etimológicamente la palabra “sensorial” proviene del latín “sensus” que quiere decir “sentido”. Algunas de las definiciones propuestas para el término “análisis sensorial” son:

“Examen de las propiedades organolépticas de un producto realizable por los sentidos” (Norma Española UNE 87-001-94, 1997).

“Ciencia utilizada para provocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a determinadas características de los alimentos y materiales, tal y como son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído” (Stone y Sidel, 1993), aceptada por la División de Evaluación Sensorial del Instituto de Tecnólogos de los Alimentos de Estados Unidos y por la Sociedad Americana para la evaluación de materiales.

El análisis sensorial engloba técnicas que miden de forma precisa las respuestas humanas a los alimentos y minimiza los potenciales efectos de desviación que pueden producirse sobre el juicio del consumidor o juez experto. Esta disciplina es una ciencia cuantitativa en la que los datos numéricos son recogidos para establecer relaciones entre las características de los productos y la percepción humana (Torre- Hernández, 2000).

Actualmente existen métodos instrumentales químicos o físicos que son utilizados para estudiar parámetros como el color, la textura, el aroma, etc. Algunos de estos métodos se han aplicado en los alimentos y recogidos en diversas investigaciones, como la “nariz electrónica” (Haugen, 2001), “lengua electrónica” (Di Natale y col., 2000), la cromatografía que determina los parámetros de color L^*a^*b (brillo, cromaticidad y balance entre colores) (Garza y col., 1999); test de deformación para establecer la firmeza (Auerswald y col., 1999). Estas técnicas se caracterizan por su rapidez, reproductibilidad y por la gran cantidad de muestras analizadas; sin embargo tienen limitaciones e inconvenientes en caso de que el número de componentes a analizar sea amplio y las interacciones entre ellos complejas. Además las medidas realizadas con instrumentos analíticos no son tan objetivas como parece, ya que también están sujetas a errores del operador. Por todo ello, el análisis sensorial puede ser el método complementario ideal que proporciona una visión integral sobre la calidad organoléptica de un alimento, teniendo en cuenta además que el éxito de un producto en el mercado depende de las reacciones subjetivas que éste provoca en el consumidor. (Ibáñez y Barcina, 2001).

A la hora de llevar a cabo la evaluación sensorial de un producto es fundamental realizar un diseño experimental previo bien definido y estructurado, de forma que sea posible sacar conclusiones al respecto. A posteriori, también es imprescindible el uso de los métodos estadísticos para analizar e interpretar los resultados obtenidos y de esta

forma decidir si las relaciones observadas entre las características de los productos y las respuestas sensoriales son reales, y no únicamente el resultado de variaciones al azar de las respuestas. De forma complementaria, otras disciplinas intervienen en el análisis sensorial: una de ellas es la psicofisiología, que explica cómo nuestros sentidos se impresionan y la posterior interpretación y respuesta en el cerebro; la psicología, que propone cómo transformar una técnica claramente subjetiva en un instrumento de medida objetivo; y la sociología, que ayuda a interpretar los resultados y conclusiones en función de los gustos y costumbres de los colectivos a quienes se dirigen los productos. (Ibáñez y Barcina, 2001).

3.3.6.3. Objetivos y funciones

Una vez aseguradas la calidad sanitaria y nutricional, la calidad sensorial y la aceptabilidad pueden ser evaluadas mediante el control sensorial de la calidad de la materia prima, las condiciones de producción y almacenamiento y las estrategias de mercado (Ibáñez y Barcina, 2001). La función principal del análisis sensorial es estudiar y traducir los deseos y preferencias de los consumidores en propiedades tangibles y bien definidas de un producto dado (Torre- Hernández, 2000). Además presenta otras aplicaciones dentro de la industria alimentaria (Figura 4), destacando principalmente:

- Control de calidad y estandarización de un alimento.
- Desarrollo de nuevos productos y formulaciones.
- Estudios de aceptación/rechazo de productos por parte de los consumidores.
- Estudios de mercado sobre el grado de preferencia de productos.
- Estimación de vida útil.
- Coordinación entre los departamentos interdependientes de una empresa.

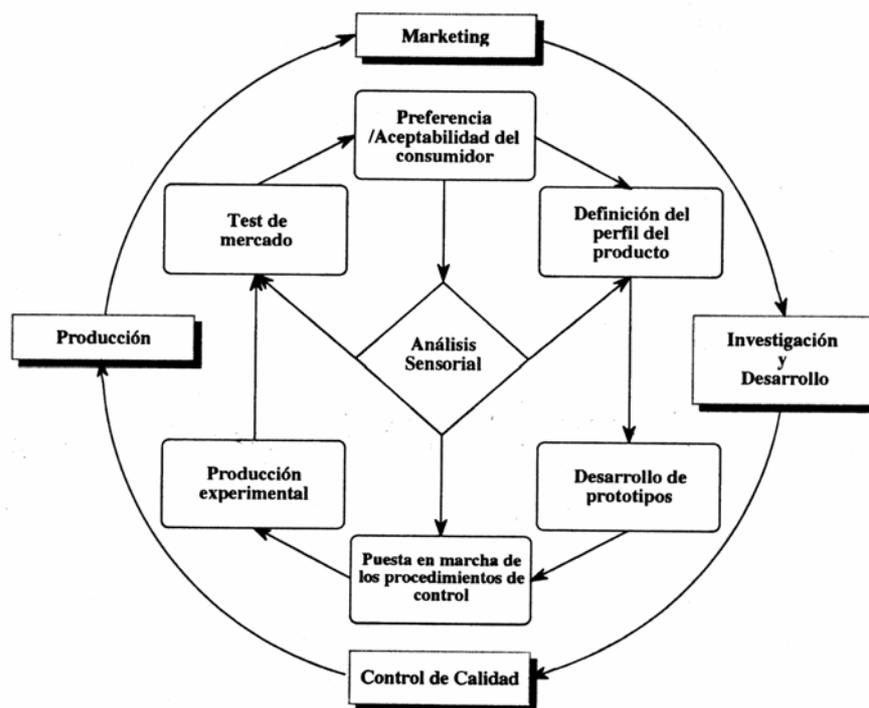


Figura 4. Papel del análisis sensorial en la industria alimentaria (Pagliarini y col., 1991, tomado de Ibañez y Barcina, 2000).

3.3.6.4. Tipos de pruebas sensoriales

En el análisis sensorial existen básicamente tres tipos de pruebas, que son las pruebas discriminantes, las afectivas y las descriptivas. Para saber qué tipo se debe emplear en cada caso, según los objetivos y cuestiones planteadas, se utilizan los llamados árboles de decisión, como el representado en la Figura 5 (Torre- Hernández, 2000).

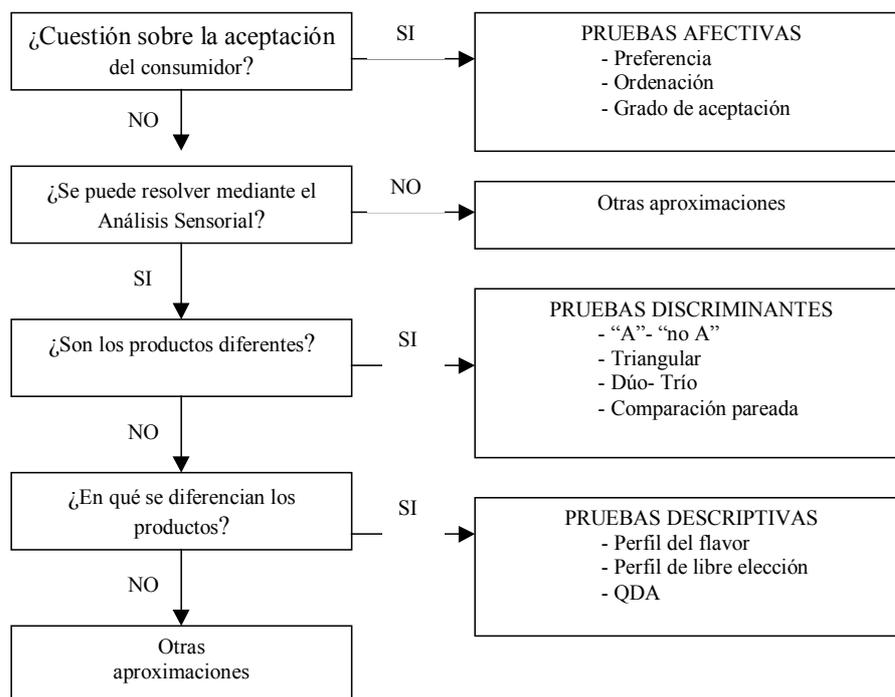


Figura 5. Arbol de decisión para elección del tipo de prueba en análisis sensorial.

3.3.6.4.1. Pruebas discriminantes

Estos ensayos tienen como objetivo determinar si existen o no diferencias entre dos o más muestras, basándose en alguna característica o teniendo en cuenta todas conjuntamente. Se suelen utilizar frecuentemente para establecer si la calidad final de un producto se afecta debido a alguna modificación en las materias primas, tratamiento, procesado o almacenamiento del producto. Para este tipo de ensayos, los paneles deben estar formados por jueces con algún entrenamiento previo sobre el análisis sensorial, ya que la elección inadecuada de panelistas puede llevar a obtener interpretaciones y conclusiones erróneas (Torre- Hernández, 2000).

Dentro de este grupo destacan la prueba de comparación pareada, prueba triangular, prueba dúo- trío, etc.

3.3.6.4.2. Pruebas afectivas

Estos ensayos dan una importante información preliminar acerca del mercado y del consumo, con relación a las preferencias, necesidades de los consumidores, reacción ante nuevos productos, etc. En este caso el panel está formado por grupos de consumidores no entrenados, a los que se les dejará total libertad para expresar su aceptación o preferencia por un producto (Torre- Hernández, 2000).

Las pruebas afectivas se pueden clasificar a su vez en tres grupos: pruebas de preferencia, de satisfacción y de consumo.

Las pruebas de preferencia se basan en la elección de una muestra entre varias de un producto dado. La forma más simple es la comparación pareada, existiendo otras más complejas, como la prueba de clasificación, que ordena muestras según el grado de agrado o desagrado.

Las pruebas de satisfacción determinan el grado en que un producto gusta o disgusta y se utilizan escalas semánticas (por ejemplo, muy agradable, moderadamente agradable... hasta muy desagradable) o escalas gráficas (por ejemplo, la escala facial que representan caras con distintos grados de satisfacción).

Las pruebas de consumo, por último, estudian los comportamientos de consumo y el interés de una persona por adquirir un determinado producto, que depende no sólo de la sensación de agrado al probarlo, sino también de aspectos culturales, sociales, económicos, etc.

3.3.6.4.3. Pruebas descriptivas

Este tipo de pruebas son utilizadas para determinar en qué magnitud se diferencian unas muestras de otras, en base a sus características principales. El panel de catadores está formado por personal seleccionado en función de su agudeza sensorial, motivación, y entrenamiento (Torre- Hernández, 2000). Las principales técnicas descriptivas son tres: el perfil del flavor, el perfil de textura y el análisis cuantitativo descriptivo.

El perfil del flavor es un método altamente descriptivo, en relación con el conjunto de percepciones de estímulos olfato- gustativos, táctiles y quinestéticos producidos por un alimento determinado. Esta técnica como tal no permite el análisis

estadístico y los diferentes resultados individuales son discutidos en grupo hasta llegar a un consenso (Guerrero, 1995).

El perfil de textura está basado en la prueba anterior y surgió como técnica de medida de los atributos de textura de los alimentos (propiedades mecánicas y geométricas, características de grasa y humedad, etc.). El principal inconveniente que presenta es la falta de reproducibilidad de las referencias primarias de textura (Guerrero, 1995).

El análisis cuantitativo descriptivo o QDA (Stone y col., 1974) surgió en respuesta a la falta de tratamiento estadístico de los datos obtenidos con los métodos anteriores. Es una técnica de caracterización de atributos sensoriales en términos cuantitativos, realizándose medidas repetidas de un mismo producto mediante escalas lineales, en las que se cuantifican cada uno de los atributos. El entrenamiento de los jueces suele ser específico al producto objeto de análisis, siendo menos extenso que en las pruebas anteriores (Guerrero, 1995). Este método se ha extendido con rapidez y se trata posiblemente del método descriptivo más utilizado aplicado en el análisis sensorial de alimentos (De Anda- Serrano y col., 1999; Armstrong y McIlveen, 2000; Chapman y col., 2001; Morita y col., 2002; Roller y col., 2002).

3.3.6.5. Jueces y condiciones de pruebas del análisis sensorial

3.3.6.5.1. Jueces

La selección y entrenamiento de las personas que tomarán parte en pruebas de evaluación sensorial son factores de los que dependen en gran parte el éxito y la validez de las pruebas. Entre los criterios fundamentales a la hora de seleccionar los jueces destacan la habilidad, la disponibilidad y el interés y motivación (Civille y Szczesniak, 1973; Larmond, 1977). La habilidad es una cualidad importante para la detección de las propiedades organolépticas, existiendo pruebas que determinan esta habilidad y que son utilizadas en el proceso de selección de los jueces. Otro factor, quizás el más determinante, es la disponibilidad, ya que es fundamental que los catadores tengan un horario compatible y flexible para realizar la evaluación sensorial (Civille y Szczesniak, 1973; Anzaldúa- Morales y col., 1983). Por último, el interés y la motivación también

son cruciales, ya que la indiferencia a la hora de realizar el análisis sensorial puede afectar la validez de los resultados (Larmond, 1977; Anzaldúa- Morales, 1983).

3.3.6.5.2. Condiciones de prueba

Las condiciones externas que rodean la evaluación organoléptica deben estar controladas y bien definidas, ya que las personas que realizan el análisis normalmente reaccionan de forma diferente ante los estímulos, pudiendo introducir desviaciones e interferencias en las medidas (Larmond, 1977). Por todo ello, para que los resultados de las pruebas sensoriales sean válidos e interpretados correctamente se deben evitar o minimizar la influencia de los siguientes factores:

Para evitar el error de expectación las muestras se deben ser presentar codificadas mediante claves de tres o cuatro dígitos; el empleo de un número simple podría hacer que el juez puntuara una muestra en relación con lo “esperado”, al asociarlo inconscientemente con ese número asignado. Por ejemplo, la muestra con el número 1 podría ser interpretada como “lo mejor” (Anzaldúa- Morales, 1994). Además los jueces no deben recibir información acerca de la prueba antes de realizarla, ni deben participar personas que estén involucradas en el planteamiento y desarrollo del experimento o investigación.

Es muy importante uniformizar las muestras en cuanto a su aspecto externo para evitar el llamado error de estímulo que podría introducir interferencias en las respuestas de los jueces (Larmond, 1977), así como para evitar el error lógico, que consiste en que el juez derive conclusiones erróneas porque le parezca que alguna característica del producto esté lógicamente asociada con otra propiedad (Anzaldúa- Morales, 1994).

Es necesario contar en el local de prueba con cabinas individuales para cada catador, evitando así el efecto de sugestión, es decir, que las reacciones y expresiones de otros jueces influyan en la apreciación personal (Larmond, 1977).

Por último, las muestras deben presentarse en orden aleatorio, para evitar el efecto de contraste que consiste en puntuar por exceso o por defecto una muestra en función de la anterior. Por ejemplo, si los jueces prueban una muestra desagradable después de otra que les gusta, esto puede suponer que puntúen a la segunda por debajo de la realidad. (Larmond, 1977).

A la hora de planear y desarrollar el análisis sensorial de un alimento es necesario tener en cuenta las condiciones de la prueba, definidas por la Norma Española UNE 87-004-79 (1997) y por otros autores (Anzaldúa- Morales, 1994; Larmond, 1977). En primer lugar estas pruebas deben realizarse en un lugar diseñado y destinado a tal efecto, donde el ambiente sea tranquilo, con una temperatura constante entre 18-23°C, sin ruidos que puedan distraer ni olores que vicien el aire y con separación entre el área de preparación de las muestras y el área de prueba. Además el local debe disponer de cubículos o cabinas individuales para cada juez, cuyas superficies tengan un color claro que no afecte la apariencia de las muestras, la iluminación sea regulable en dirección, intensidad y color y presenten en el frontal una ventanilla con cubierta corrediza para presentar las muestras desde el área de preparación.

Otra condición de la prueba a controlar se refiere a las muestras evaluadas, y de este modo, el número de muestras por sesión para cada catador no debe ser superior a cinco, ya que de lo contrario se puede provocar el fenómeno de fatiga o hastío (Larmond, 1977). Además, la cantidad de muestra no debe ser excesiva, eludiendo así la sensación molesta de saciedad que puede hacer que el juez sienta desagrado o repugnancia por las muestras. Por último, deben servirse a la una temperatura próxima a la que el alimento es consumido y en el horario apropiado, entre las 11 y 13 horas; de esta forma, se deben evitar horas muy cercanas a las del desayuno (ya que el juez no estará muy dispuesto a ingerir alimentos) o cercanas a la comida (pues el juez tendrá hambre y cualquier cosa que pruebe le agrada) (Anzaldúa- Morales y col., 1983; Anzaldúa- Morales, 1994).

3.3.5.6. Análisis sensorial de productos cárnicos

La aplicación del análisis sensorial en el ámbito de la industria cárnica tiene una gran relevancia y creciente interés en los últimos años. De este modo, se ha llevado a cabo estudios sensoriales sobre gran variedad de carnes, productos cárnicos cocidos (salchichas, jamón cocido, pechuga de pollo cocida, etc.) y productos cárnicos curados (jamón curado, embutidos, etc.). Estas investigaciones tienen como objetivo establecer la calidad sensorial de los productos en diversas situaciones experimentales, como la adición conservantes a los productos cárnicos (Ruiz y col., 2001; Coronado y col., 2002; Nassu y col., 2003), el efecto de factores físicos y químicos (Murano y col., 1999;

Crehan y col., 2000; Byrne y col., 2001) o el efecto del envasado al vacío o en atmósferas modificadas (Coventry y col., 1998; Luño y col., 1998; Bredholt y col., 2001; Fernández-Fernández y col., 2002), etc.

En otros casos, la finalidad del estudio sensorial ha sido establecer la influencia de factores relacionados con la materia prima en la calidad y aceptabilidad del producto final (Bañón y col., 2002; Candek-Potokar y col., 2002). También son destacables los trabajos científicos publicados que realizan estudios combinados entre el análisis sensorial y el análisis instrumental (Otremba y col., 1999; Brondum y col., 2000), u otros trabajos que estudian la relación existente entre la calidad sensorial y microbiológica de productos cárnicos cocidos (Rodríguez- Pérez y col., 2003).

Según lo expuesto con anterioridad, se muestra claramente la importancia de esta ciencia experimental, el análisis sensorial, que gana en interés en los últimos años debido a la gran variedad de aplicaciones para la industria cárnica.

IV. MATERIAL Y METODOS

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Material

- Aceite de parafina (Panreac, 141003)
- Agar Baird Parker (Oxoid, CM275)
- Agar Bacteriológico (Oxoid, L11)
- Agar Man Rogosa Sharpe (MRS, Scharlau, 01-135)
- Agar Plate Count (PCA, Oxoid, CM325)
- Agar Potato Dextrosa (PDA, Oxoid, CM139)
- Agar Streptomycin Thalium Acetate (STAA, CM881)
- Agar Sulfito-Bismuto (Difco, 0073-01-1)
- Agar Sulfito-Polimixina-Sulfodiácina (SPS, Difco, 0845-01-8)
- Agar Triple Sugar Iron (TSI, bioMérieux, 51047)
- Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Oxoid, CM485)
- Agua de peptona tamponada (Oxoid, CM509)
- Analizador *Bioscreen C* y software *Biolink* (Labsystem, Finlandia)
- Balanza de precisión, autoclave, baño termostático, frigorífico, mezclador Vortex, agitador magnético
- Bolsas de polipropileno para envasado de alimentos (*Sacoliva* Pape 150, Barcelona)
- Cabina estéril por flujo laminar vertical CV-100 (Burdinola, Vizcaya)
- Caldo Lactosado (Oxoid, CM137)
- Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, Scharlau, 02-135)
- Caldo Selenito Cistina (Difco, 0687-17-1)
- Caldo Triptona Soja (TSB, Oxoid CM129)
- Caldo Verde Brillante (Oxoid, CM31)
- Cámara de CO₂
- Cámaras para incubación a 2.3, 6.5, 10, 13.5, 17.7 y 30°C (JP Selecta, España)

- Cepa nº 219 de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (Burjasot, Universidad de Valencia)
- Cloruro sódico (Panreac 121659)
- Contador de colonias *Digital-S 5905000* (Comecta, Barcelona)
- Envasadora *Audionvac* (Audion Elektro B. V., Holanda)
- Filtros *Whatman* de 0.2 µm (Whatman International Ltd. Maidstone, Reino Unido)
- Kit Tinción Gram- Hucker (Panreac, 254884)
- Material de vidrio diverso, asas de siembra, cajas de Petri desechables 90 × 15 mm, mechero Bunsen, pinzas y tijeras estériles
- Microbank™ (Pro- Lab, Diagnostics, Canadá)
- Medio Sulfuro, Indol, Movilidad (SIM, CM435)
- Nitrito sódico (Panreac, 131703)
- pHmetro *Crison Basic 20* (Alella, Barcelona)
- Picadora *Moulinex* (Moulinette, CE)
- Pipetas graduables *Nichiryo* de 10-100 y 100-1000 µl (Tokyo, Japón)
- Placas *Honeycomb* multipocillos (Labsystem, Finlandia)
- Sistema de identificación microbiológica API (Analytical Profile Index, BioMérieux, Madrid)
- Solución de ácido clorhídrico 5N (Panreac, 141019)
- Solución de hidróxido sódico 5N (Panreac, 182159)
- Solución Salina Fisiológica (0,85% NaCl)
- Stomacher *400 Seward* (Reino Unido)

4.2. Métodos

4.2.1. Evaluación microbiológica de productos cárnicos cocidos

Con la matriz alimentaria se llevó a cabo un estudio en el que se determinó la presencia de microorganismos patógenos y el crecimiento, recuento e identificación de microorganismos alterantes, con el fin de determinar el principal grupo de bacterias alterantes que serán objeto de los modelos predictivos de crecimiento en los productos cárnicos cocidos. Paralelamente, se determinó la evolución del pH de las muestras en relación con el crecimiento microbiano. Las medidas se hicieron con un potenciómetro Crison pH-meter (Basic 20, Barcelona), realizando diluciones decimales en Solución Salina Fisiológica y trituradas en el Stomacher.

Tres productos cárnicos cocidos de la empresa Campofrío Alimentación, S.A. (Alcobendas, Madrid) han sido seleccionados para la realización de nuestro trabajo. Éstos son el jamón cocido, de gran demanda de consumo y la pechuga de pavo y de pollo cocida, de gran aceptación por su bajo contenido graso. Las características composicionales que presentan estos productos se representan en la Tabla 6.

Tabla 6. *Parámetros fisicoquímicos de la matriz alimentaria*

<i>Parámetro</i>	<i>Jamón cocido</i>	<i>Pechuga de pavo</i>	<i>Pechuga de pollo</i>
pH	6.32	6.22	6.31
a _w	98.3	97.1	97.1
Humedad (%)	72.10	78.50	77.44
NaCl (%)	1.84	2.40	1.76
NaNO ₂ (ppm)	30	29	39
NaNO ₃ (ppm)	75	26	32
Grasa (%)	6.40	0.75	0.77
Proteína (%)	18.45	15.24	15.53

Los productos cárnicos cocidos (jamón, pechuga de pavo y pechuga de pollo) fueron adquiridos en una gran superficie comercial, siendo almacenados a su llegada al laboratorio a una temperatura de 3°C hasta el momento de su utilización.

En primer lugar se tomaron de forma aséptica muestras con un peso de 25 g cada una a partir de las piezas cárnicas objeto de nuestro estudio. Seguidamente las muestras se envasaron a vacío mediante una envasadora Audionvac 151HG (Audion Elektro, B.V., Holland) en bolsas de película plástica semipermeable de polipropileno (Sacoliva Pape 150, Barcelona). Estas bolsas, con unas medidas específicas de 15 cm × 30 cm, tienen unas características de permeabilidad especificadas por el productor de 8 cc/m²/24h, 230 cc/m²/24h y 2 g/m²/24h, para el oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua, respectivamente.

Por último las muestras se distribuyeron en cinco lotes en función de la temperatura de almacenamiento para su análisis a lo largo del tiempo de estudio. Se siguió un Diseño Central Compuesto para la elección de las temperaturas, que fueron: 2.3° y 6.5°C (refrigeración adecuada), 10° y 13.5°C (abuso moderado de temperatura) y 17.7°C (grave abuso de temperatura).

4.2.1.1. Microorganismos patógenos

La Legislación española establece que en los productos cárnicos cocidos debe controlarse la presencia de ciertos microorganismos patógenos (Orden. 29/6/83). Dichos controles fueron realizados al principio, a la mitad, y al final del experimento, siendo las técnicas y medios de cultivo los recomendados en la bibliografía.

La presencia de *Salmonella-Shigella* se investigó con la siembra en Caldo Lactosado, incubando a 37°C durante 48 horas; a continuación en caldo Selenito-Cistina, a 37°C durante 48 horas; finalmente en agar Verde-Brillante o Sulfito-Bismuto, a 37°C durante 24 y 48 horas respectivamente (ICSMF, 1982).

Clostridios sulfito-reductores se determinó en agar Sulfito-Polimixina-Sulfodiácina (SPS), incubando a 37°C en anaerobiosis durante de 24 horas (ICSMF, 1982).

La investigación de *Enterobacterias totales* se llevó a cabo en agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG) a 37°C durante 24 horas (Pascual Anderson y Calderón y Pascual, 2000).

Finalmente *Staphylococcus aureus* se determinó en agar Baird-Parker a una temperatura de 37°C durante 48 horas (Pascual Anderson y Calderón y Pascual, 2000).

En todos los casos el análisis microbiológico se realizó siguiendo siempre el mismo procedimiento. Se tomaron dos muestras de cada temperatura, a las que se les añadió 225 ml de agua de peptona al 0.1%, homogeneizándose el contenido en el Stomacher durante 30 segundos. A partir de éste se hicieron diluciones decimales igualmente en agua de peptona al 0.1% y se sembró en caldo o agar según el microorganismo y técnica empleada.

4.2.1.2. Microorganismos alterantes

El recuento de microorganismos alterantes en los tres productos cárnicos incluyó el control de bacterias ácido lácticas, microorganismos psicrotrofos, *Brochothrix thermosphacta*, levaduras y mohos.

En cada uno de los controles, que se distribuyeron a lo largo de un tiempo máximo de 45 días, se tomaron 2 muestras de cada una de las temperaturas de almacenamiento. Se añadió 225 ml de agua de peptona al 0.1% a 25 g de muestra que fue triturada y homogeneizada en el Stomacher. Se hicieron diluciones decimales seriadas de cada muestra y posteriormente se sembró un volumen determinado en cada tipo de medio de cultivo en función del microorganismo a estudiar.

El recuento de *bacterias ácido lácticas* (BAL) se realizó a partir de las diluciones decimales, sembrando por duplicado 1 ml de cada dilución en agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe, 1960) en masa. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas en una atmósfera anaeróbica con 10% de CO₂ (Garg y col., 1990).

Los *microorganismos psicrotrofos* fueron determinados siguiendo el método recomendado por el ICMSF (1982); así se tomaron 0.1 ml de las diluciones del alimento y se sembró en agar PCA (Plate Count Agar) en superficie por duplicado, incubándose las placas a 7°C durante 10 días.

Para estudiar la presencia y evolución de *Brochothrix thermosphacta* se sembró por duplicado en superficie 0.1 ml de las diluciones, en agar STAA (Streptomycin sulfato-Talio-Acetato-Actidiona) para incubar las placas a una temperatura de 25°C durante un periodo de 48 horas (Gardner, 1966).

Por último, el crecimiento de *Levaduras y Mohos* fue evaluado en agar PDA (Potato Dextrosa Agar) mediante la siembra en superficie de 0.1 ml de las diluciones,

para posteriormente ser incubados durante 3-5 días a una temperatura de 25°C (ICSMF, 1982).

Para BAL y bacterias psicrotrofas se realizó el aislamiento y posterior identificación de género y especie. En el caso de BAL, de forma adicional a la tinción Gram y a la morfología, se realizaron otras pruebas complementarias en función de sus características específicas recogidas en el Manual Bergey's of Systematic Bacteriology (Sneath y col., 1986):

- Prueba catalasa y oxidasa.
- Tolerancia a la concentración salina, que fue testada en caldo TSB (Oxoid) con un suplemento de 3% NaCl a 30°C.
- Crecimiento a determinada concentración de etanol, que fue observado en caldo TSB (Oxoid) con 10% de etanol adicionado a 30°C.
- Crecimiento a distintos valores de pH fue determinado en caldo TSB (Oxoid), ajustado con HCl a pH 4.8 y 6.6 a 30°C.
- Crecimiento a 15°C fue testado en caldo MRS (Oxoid) incubando durante un periodo de 48-72 horas.
- Producción de gas desde la glucosa fue determinada en caldo MRS (Oxoid) conteniendo campanitas Durham invertidas, incubando a 30°C durante 24-48 horas.
- Fermentación de glucosa, galactosa y/o sacarosa, así como la producción de SH₂ (ennegrecimiento) fueron observadas en agar TSI (bioMérieux), sembrando por picadura y estría e incubando a 30°C durante 24-48 horas

Para las bacterias psicrotrofas, además de la tinción Gram y la morfología, se realizaron las siguientes pruebas complementarias, según sus características bioquímicas recogidas en el Manual Bergey's of Systematic Bacteriology (Sneath y col., 1986):

- Prueba catalasa y oxidasa.
- Crecimiento a 10°C, 15°C y 45°C fue testado en caldo TSB (Oxoid) incubando durante un periodo de 48-72 horas.

Según los resultados obtenidos y de forma complementaria se utilizó para cada caso el adecuado Sistema de identificación API (Analytical Profile Index, BioMérieux, Madrid), tales como API 50 CHLactobacillus, API 20NE, API Strep y API Staph junto con el programa informático API plus.

4.2.2. Elaboración de los modelos predictivos de crecimiento de *L. mesenteroides*

4.2.2.1. Diseño experimental

Para la obtención de datos de absorbancia en el Bioscreen C se elaboró un Diseño Central Compuesto (DCC), el cual comprende las condiciones experimentales que aparecen en la Tabla 7. Se seleccionaron como variables más importantes la temperatura (°C), pH, concentración de cloruro sódico (%), concentración de nitrito sódico (ppm) y atmósfera aeróbica/anaeróbica, para estudiar el efecto combinado de las mismas en el crecimiento de *L. mesenteroides* en caldo de cultivo MRS. Se realizaron seis réplicas en el centro del diseño experimental para estimar la varianza experimental.

Los rangos de las variables estudiadas fueron escogidas teniendo en cuenta los procesos seguidos por la industria cárnica y comprendieron los siguientes valores:

- Temperatura (°C): 10.5, 14, 17.5, 21, 24.5°C
- pH: 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5
- Concentración de NaCl (%): 0.25, 1.75, 3.25, 4.75, 6.25
- Concentración de NaNO₂ (ppm): 0, 50, 100, 150, 200
- Condiciones de la atmósfera: aerobiosis y anaerobiosis

Como límite inferior de temperatura se estableció 10.5°C ya que este valor es próximo a la temperatura mínima de crecimiento de *L. mesenteroides* según el Manual Bergey's of Systematic Bacteriology (Sneath y col., 1986) y de este modo estudiar el efecto de las temperaturas de refrigeración sobre el crecimiento o supervivencia del microorganismo. El límite superior del diseño se estableció en 24.5°C, con el fin de conocer el efecto de un grave abuso de temperatura en el crecimiento de *L. mesenteroides*. Para el resto de variables estudiadas (pH, concentración de cloruro

sódico, concentración de nitrito sódico y condiciones de la atmósfera) el rango del diseño fue amplio con el objeto de englobar las diversas características de los productos cárnicos.

Tabla 7. *Condiciones experimentales del Diseño Central Compuesto establecidas para la elaboración de modelos predictivos de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides**

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl (%)</i>	<i>NaNO₂ (ppm)</i>
10.5	6.5	3.25	100
14	6	1.75	50
14	6	1.75	150
14	6	4.75	50
14	6	4.75	150
14	7	1.75	50
14	7	1.75	150
14	7	4.75	50
14	7	4.75	150
17.5	5.5	3.25	100
17.5	6.5	0.25	100
17.5	6.5	3.25	0
17.5*	6.5	3.25	100
17.5*	6.5	3.25	100
17.5*	6.5	3.25	100
17.5*	6.5	3.25	100
17.5*	6.5	3.25	100
17.5*	6.5	3.25	100
17.5	6.5	3.25	200
17.5	6.5	6.25	100
17.5	7.5	3.25	100
21	6	1.75	50
21	6	1.75	150
21	6	4.75	50
21	6	4.75	150
21	7	1.75	50
21	7	1.75	150
21	7	4.75	50
21	7	4.75	150
24.5	6.5	3.25	100

* condiciones centrales del DCC

4.2.2.2. Cepa de estudio

La cepa de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* utilizada en nuestro estudio fue la número 219, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjasot, Universidad de Valencia). Entre sus características más destacables están la síntesis de la enzima lactodeshidrogenasa, la producción del metabolito dextrano tipo C, así como el crecimiento a una temperatura óptima de 26°C (CECT, 1998).

4.2.2.3. Elaboración de la recta de calibrado

Para conocer la concentración de células (ufc/ml) que se corresponde con un valor de absorbancia se confeccionó una recta de calibrado enfrentando lecturas de absorbancia frente a recuento en placa. Los valores de recuento en placa se determinaron a partir de una serie de diluciones de un cultivo en fase estacionaria temprana de *L. mesenteroides*, incubado a 30°C durante 18 horas en caldo MRS. Se realizó la siembra del microorganismo a partir de las diluciones seriadas en caldo MRS en placas de MRS agar, las cuales se incubaron a 30°C durante 48 horas en una atmósfera anaeróbica con 10% de CO₂.

Las medidas de densidad óptica se realizaron con ayuda del espectrofotómetro Bioscreen C, utilizando el filtro de 600 nm. Se realizaron series de diluciones en caldo MRS del inóculo para evitar lecturas cuya turbidez (muy elevada o demasiado baja) no fuera diferenciable por el aparato. Se dispusieron 250 µl de cada una de las diluciones por triplicado en los pocillos, para aceptar como válidos aquellos valores de densidad óptica en los que se observa una relación lineal entre absorbancia y concentración microbiana.

Los datos de recuento en placa, expresados como Log₁₀ ufc/ml, se representarán gráficamente frente a los datos de absorbancia para la elaboración de la recta de calibración y para establecer el límite de detección del instrumento. La relación entre las medidas de absorbancia y los valores de recuento en placa se calculará a partir del coeficiente de Regresión múltiple (R²).

4.2.2.4. Preparación de los medios de cultivo

Para preparar las condiciones experimentales descritas en el diseño se tomaron una serie de frascos con 100 ml de caldo MRS (medio de cultivo recomendado por la CECT para *L. mesenteroides*) a los cuales se añadió NaCl, en concentraciones tales que finalmente se alcanzarán niveles de 0.25 hasta 6.25%. A este medio resultante se le ajustó el pH utilizando soluciones de HCl (5N) y NaOH (5N), hasta valores comprendidos entre 5.5 y 7.5, y se distribuyó en tubos en un volumen de 9.9 ml. A continuación se esterilizó mediante autoclave, a 121°C durante 15 minutos, tras lo cual se verificó el pH ajustado de los medios de cultivo.

Paralelamente se prepararon soluciones de NaNO₂ en volúmenes de 10 ml, las cuales se esterizaron mediante técnicas de filtración con filtros Whatman de 0.2 µm (Whatman International Ltd. Maidstone), debido a la pérdida de estabilidad térmica de los nitritos. Posteriormente se dispensaron volúmenes de 0.1 ml de estas soluciones en los 9.9 ml de caldo MRS descritos anteriormente hasta conseguir las concentraciones finales de 0 a 200 ppm deseadas.

4.2.2.5. Preparación del inóculo

La cepa de *L. mesenteroides* 219 liofilizada fue reconstituida según el protocolo descrito por la Colección Española de Cultivos Tipo y mantenida en congelación mediante el sistema de perlitas de Microbank. Para la preparación del inóculo, una perlita fue incubada a 30°C durante 24 horas en caldo MRS (pH 6.2, sin NaCl añadido) y subcultivada durante tres días sucesivos, transfiriendo 100 µl de cultivo a 10 ml de caldo MRS. El tercer subcultivo se incubó durante 18 horas, periodo en el que ha alcanzado una fase estacionaria temprana. A partir de éste, se realizaron las diluciones necesarias en caldo MRS para obtener un tamaño de inóculo de 10⁶ ufc/ml. A partir de diluciones decimales seriadas en caldo MRS, el tamaño del inóculo fue confirmado mediante recuento en placa en agar MRS incubadas a 30°C durante 24 horas en cámara con 10% de CO₂.

4.2.2.6. Obtención de las curvas de crecimiento mediante el Bioscreen C

El crecimiento del microorganismo se manifiesta con un incremento de la turbidez del medio MRS a una velocidad que estará en función de la condición experimental. Por tanto, se producirá un incremento de la densidad óptica y *L. mesenteroides* describirá una curva de crecimiento de densidad óptica en función del tiempo para cada condición.

En cada pocillo de las placas del Bioscreen C se transfirieron 200 µl de caldo MRS estéril de las distintas condiciones preparadas y 50 µl de inóculo de *L. mesenteroides* a una concentración próxima a 10^6 ufc/ml. Para cada una de las combinaciones de las variables (pH, NaCl, NaNO₂, aerobiosis/anaerobiosis) se realizaron 7 réplicas, para todas las temperaturas de incubación incluidas en el diseño experimental. Paralelamente se colocaron pocillos controles de cada condición con 250 µl de medio sin inocular, que sirvieron como blanco y también para chequear la esterilidad del medio.

Cada combinación de factores se realizó por duplicado, para obtener condiciones experimentales en aerobiosis y anaerobiosis, para obtener finalmente 420 curvas de crecimiento bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Con el fin de simular el ambiente anaeróbico, la mitad de los pocillos se recubrieron con 200 µl de parafina líquida.

Una vez preparadas las placas multipocillos, éstas se introdujeron en el espectrofotómetro Bioscreen C, que realizó lecturas verticales del total de las 200 muestras líquidas. Mediante la ayuda del software *Bioblink*, operando en *MSDOS*, los datos de absorbancia son procesados y los archivos se pueden transferir al programa Excel. Los parámetros de medida programados para el espectrofotómetro fueron:

- Tipo de Medida: *Simple*
- Forma de Medida: *Cinética*
- Longitud de onda: *600 nm*
- Temperatura de incubación (°C): *según el caso*
- Tiempo de precalentamiento (minutos): *15*
- Tiempo de medida: *según el caso*

- Intervalo de tiempo entre medidas: *1 hora*
- Intensidad de agitación de placas multipocillo: *Media*
- Régimen de agitación: *Anterior a la lectura*
- Tiempo de agitación: *10 segundos*

4.2.2.7. Ajuste de los datos de crecimiento al modelo primario

Los valores de densidad óptica obtenidos, tras restarle el valor del blanco para cada tiempo, se transformaron a logaritmo neperiano para homogeneizar la variabilidad. A continuación estos valores de absorbancia resultantes, enfrentados al tiempo, fueron ajustados al modelo primario de Baranyi y Roberts (1994) con la ayuda del programa DMFit 1.0 (József Baranyi, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UA, UK) el cual nos permite obtener los principales parámetros cinéticos de crecimiento de *L. mesenteroides* para las condiciones experimentales estudiadas.

DMFit es un programa basado en Visual Basic, para operar en Excel, que permite modelar la variación del logaritmo de la concentración celular de cultivos bacterianos a lo largo del tiempo.

La diferencia fundamental entre la fórmula de Baranyi y Roberts (1994) y otras curvas sigmoidales tales como la ecuación de Gompertz, es que la fase exponencial es muy similar a una recta, a diferencia de otras funciones que describen una curvatura muy pronunciada (Jason, 1983; Einarsson y Erickson, 1986).

Para el ajuste de los datos el programa dispone de tres opciones:

- Función de Gompertz (Gibson y col., 1987)
- Función de Baranyi y Roberts (1994)
- Función de Baranyi y Roberts (1994) reparametrizada para utilizarla con datos diferentes a recuentos bacterianos, donde la magnitud de la unidad no influye en el ajuste

Entre las tres opciones se eligió la tercera ya que en nuestro caso no trabajamos con recuentos, sino con datos de absorbancia. Otro motivo para la elección de la función de Baranyi y Roberts (1994), es que la ecuación modificada de Gompertz presenta

inconvenientes como son falta de ajuste con datos de crecimiento bacteriano y la sobreestimación del valor de la tasa de crecimiento de cultivos microbianos entre un 10 y 20% (Baranyi, 1992; Whiting y Cygnarowicz-Provost, 1992; Baranyi y col., 1993b; Ross, 1993a; Dalgaard y col., 1994; Dalgaard, 1995; Membre y col., 1999). El modelo de Baranyi y Roberts (1994) proporciona valores de tasa de crecimiento prácticamente idénticos a los que se obtienen con el modelo Logístico y exponencial (Dalgaard y col., 1994; Dalgaard, 1995).

Para trabajar con el programa DMFit los datos deben dispuestos en el formato requerido por el mismo (archivo "csv", delimitado por comas). El programa DMFit calcula los parámetros del mejor ajuste de la curva, junto con otros índices computacionales y estadísticos. Presenta algunas limitaciones técnicas, tales como que el número máximo de puntos fijados por curva son 500.

El principal parámetro cinético, denominado tasa o velocidad de crecimiento '*rate(pot)*', es la tasa máxima potencial del modelo, el cual puede ser incluso de valor negativo, por descenso en el número de bacterias. Este parámetro es potencial porque, teóricamente, esta velocidad nunca es exactamente alcanzada por el ajuste de la curva, debido a las funciones limitantes aplicadas que tienen un escaso efecto, incluso en la fase lineal. Sin embargo, la diferencia entre la tasa potencial y la tasa máxima real, denominada por el programa como '*rate(num)*' es imperceptible, si los parámetros de curvatura no son muy pequeños.

Es recomendable trabajar con la transformación de las medidas de absorbancia a logaritmo neperiano para cada tiempo permite obtener directamente la tasa máxima específica de crecimiento, siendo recomendable trabajar con este parámetro expresado de tal manera (Dalgaard y Mejholm, 1996; Nerbrink y col., 1999). Para conseguir un ajuste más óptimo de las lecturas de absorbancia, es aconsejable modificar los parámetros de curvatura con valores de *mcurv*=1 y *ncurv*=10, en el caso de que el cultivo experimente un repentino crecimiento posterior a la fase de adaptación (Baranyi y col., 1993b). En este caso existen diferencias en el cálculo de la *rate(pot)* y *rate(num)* por lo que en el momento de escoger entre ellas la tasa geométrica, *rate(num)*, es la más realista y con la cual se recomienda trabajar (Pin; comunicación personal).

El parámetro de crecimiento denominado '*lag*' hace referencia a la duración de la fase de adaptación, tal y como es descrita por Baranyi y Roberts (1994). El parámetro '*y0*' es el punto inicial de la curva sigmoideal y el parámetro '*yEnd*' es la asíntota superior de la curva (o la inferior si la curva es de descenso de crecimiento). Los parámetros de curvatura, '*nCurv*' y '*mCurv*' (al principio y final de la fase lineal respectivamente), pueden tomar valores comprendidos entre 0 y 20.

Los modelos predictivos se elaboraron directamente a partir de las medidas de absorbancia para cada tiempo, en función a los resultados obtenidos en diversos estudios, que indican que la turbidimetría un método rápido y fiable para la obtención de datos con los que elaborar modelos matemáticos (Dalgaard y col., 1997; Neumeyer y col., 1997a; Nerbrink y col., 1999; Barco, 2001; Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Castillejo, 2002).

4.2.2.8. Ajuste de los parámetros cinéticos a modelos secundarios

El efecto combinado de los factores ambientales estudiados (temperatura, nivel de pH, concentración de cloruro sódico y de nitrito sódico) sobre el crecimiento de *L. mesenteroides* se determinó en caldo MRS en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Mediante los datos de absorbancia obtenidos con el analizador Bioscreen C y ajustados a la ecuación de Baranyi y Roberts (1994), obtendremos los principales parámetros cinéticos, tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y densidad máxima de población (*yEnd*), con los que se elaborarán los modelos predictivos secundarios de crecimiento de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*.

Se realizará un análisis de varianza para establecer si existen diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales estudiadas. Además se confeccionará una matriz de correlación con el fin de determinar el efecto que ejercen los factores ambientales en la respuesta de crecimiento de *L. mesenteroides*.

Los parámetros cinéticos de crecimiento de *L. mesenteroides* estimados (μ_{max} , λ e *yEnd*) se relacionarán con los factores ambientales estudiados mediante la obtención de los modelos predictivos secundarios de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN).

La aptitud de los modelos predictivos elaborados para describir el crecimiento de *L. mesenteroides* será determinada mediante una serie de herramientas matemáticas, como son el valor del Coeficiente de regresión múltiple (R^2), el estadístico Raíz del error cuadrático medio (*RMSE*), el error estándar de las predicciones (*SEP*) y de los índices Sesgo (B_f) y Exactitud (A_f) desarrollados por Ross (1996). Para el cálculo de estos estadísticos e índices se compararán los valores obtenidos mediante las ecuaciones predictivas con los valores observados en las mismas condiciones y que fueron utilizados para elaborar los modelos.

4.2.2.8.1. Modelo de Respuesta en Superficie

El modelo de RS se estructura a partir de los valores de tasa de crecimiento, fase de adaptación y densidad máxima de población obtenidos mediante el modelo primario. En la elaboración del modelo secundario se toman el 75% de los datos totales y el 25% restante para la validación interna o generalización del modelo.

Para elaborar el modelo de regresión lineal de Respuesta en Superficie se utilizó el programa SPSS 8.0. En las ecuaciones polinómicas desarrolladas para los tres parámetros cinéticos se incluirán términos que contengan los cuadrados y los productos cruzados de las variables estudiadas. Las ecuaciones serán simplificadas teniendo en cuenta los errores residuales y eliminando aquellos términos no estadísticamente significativos ($p > 0.05$). Debido a que la variación normalmente se incrementa al aumentar la velocidad o tasa de crecimiento o el tiempo, se emplearán distintas transformaciones matemáticas con el fin de normalizar la varianza.

4.2.4.2. Modelo de Redes Neuronales Artificiales

La red neuronal se estructura a partir de los valores de tasa de crecimiento y fase de adaptación obtenidos a partir del modelo primario. En la elaboración de la red neuronal se toman el 75% de los datos totales para la fase de entrenamiento o aprendizaje del modelo y el 25% restante para la fase de generalización o validación interna.

La red inicial presenta una estructura con cuatro entradas, que son las variables experimentales (temperatura, pH, concentración de cloruro sódico y concentración de nitrito sódico), una capa intermedia u oculta y la salida, que son la tasa máxima

específica de crecimiento (μ_{max}), la fase de adaptación (λ) y la densidad máxima de población (y_{End}) (Figura 6). La estructura de la red se expresa de la siguiente forma:

"n° de nodos de entrada": "n° de nodos ocultos" s : "n° de nodos de salida" l

donde: s significa que la función de transferencia hacia los nodos de la capa oculta es sigmoideal y l significa que la función de transferencia hacia los nodos de salida es lineal.

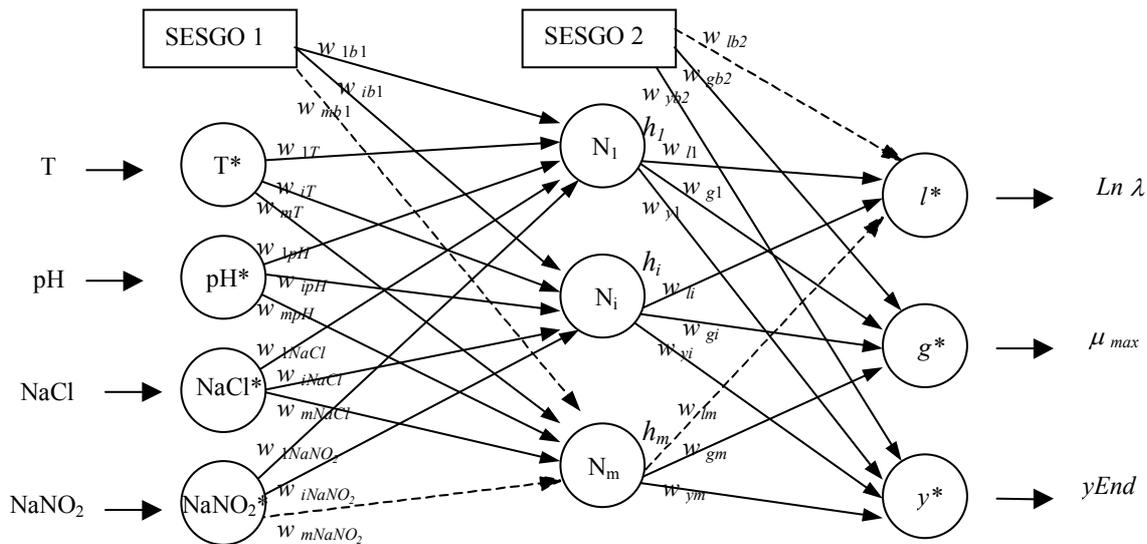


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la red neuronal artificial

Para empezar a procesar los datos, cada una de las variables de entrada y de salida deben ser escaladas en el rango comprendido entre 0.1 y 0.9 para evitar problemas de saturación en la función sigmoideal de la red y mejorar el proceso de aprendizaje (Najjar y col., 1997; Hervás y col., 2000, 2001a, b; García- Gimeno y col., 2002). Las funciones sigmoideal y lineal son usadas para los nodos de entrada y de salida respectivamente. Las nuevas variables escaladas serán T^* , pH^* , $NaCl^*$ y $NaNO_2^*$, y los parámetros de salida, l^* (fase de adaptación- lag time-), g^* (tasa máxima de crecimiento- growth rate-) e y^* (densidad máxima de población).

Para escalar cada una de las variables se utilizará una expresión como la siguiente:

$$X^* = 0.8 \frac{X - X_{min}}{X_{max} - X_{min}} + 0.1 \quad (27)$$

siendo X^* el valor escalado de la variable (T, pH, NaCl o NaNO_2), X el valor original y X_{max} y X_{min} los valores máximos y mínimos de dicha variable.

De esta manera, las salidas de las neuronas de la capa intermedia las obtendremos mediante la expresión

$$h_i = \frac{1}{1 + \exp^{-(w_{i,b1} + w_{i,T}T^* + w_{i,pH}pH^* + w_{i,NaCl}NaCl^* + w_{i,NaNO_2}NaNO_2^*)}} \quad (28)$$

Los parámetros de crecimiento de cada curva se expresarán de la forma:

$$l^* = w_{l,b2} + w_{l,1}h_1 + \dots + w_{l,i}h_i + \dots + w_{l,m}h_m \quad (29a)$$

$$g^* = w_{g,b2} + w_{g,1}h_1 + \dots + w_{g,i}h_i + \dots + w_{g,m}h_m \quad (29b)$$

$$y^* = w_{y,b2} + w_{y,1}h_1 + \dots + w_{y,i}h_i + \dots + w_{y,m}h_m \quad (29c)$$

El último paso será desescalar para obtener los valores de los parámetros en su rango original, y así, para la fase de adaptación:

$$\text{Ln } \lambda = \text{'Ln lag'} = \frac{(\text{max lag} - \text{min lag}) \times (l^* - 0.1)}{0.8} + \text{min lag} \quad (30)$$

Y análogamente para la tasa máxima de crecimiento, el valor desescalado será:

$$\mu_{max} = 'g rate' = \frac{(max\ g\ rate - min\ g\ rate) \times (g^* - 0.1)}{0.8} + min\ g\ rate \quad (31)$$

Y para la densidad máxima de población:

$$yEnd = \frac{(max\ yEnd - min\ yEnd) \times (yEnd^* - 0.1)}{0.8} + min\ yEnd \quad (32)$$

Se realiza la generación al azar de 100 redes con la misma topología y diferentes pesos y conexiones. Mediante un algoritmo de retropropagación se lleva a cabo una búsqueda en paralelo con dos fases: la selección y la mutación y cruce de pesos. Cuando la red no mejora de forma significativa por estos procesos se lleva a cabo la poda mediante un algoritmo de poda y se repite de nuevo todo el proceso (generación, selección, mutación y cruce) hasta otra generación a la cual se le aplica el algoritmo de poda; tras esta segunda generación se dice que la red ha convergido (Hervás y col., 2001b), algoritmo el cual se ha desarrollado en lenguaje C.

El algoritmo de retropropagación busca la función de aptitud de la red y lo hace mediante el método de mínimos cuadrados en la selección, mutación y cruce y mediante la búsqueda de los mínimos pesos en la fase de poda. Todo este proceso se repite 10 veces (runs) y se escoge el modelo mejor, es decir, con menor error y menor número de conexiones. El error se estima mediante el SEP de la siguiente forma:

$$\%SEP = \frac{100}{media\ obs} \sqrt{\frac{\sum (obs - pred)^2}{n}} \quad (33)$$

donde *obs*: valor observado; *pred*: valor predictivo o estimado; *media obs*: valor promedio de los valores observados; *n*: numero de datos usados.

La técnica de poda reduce el tamaño de la red modificando no sólo los parámetros de conexión (pesos), sino también la estructura de la red durante el entrenamiento; de esta forma, partiendo de una red diseñada con un excesivo número de nodos, gradualmente se irán eliminando aquellos nodos y conexiones innecesarias (Le Cun y col., 1990; Hassibi y Stork, 1993).

4.2.5. Validación de modelos predictivos de crecimiento de *L. mesenteroides*

La evaluación de la fiabilidad o bondad de ajuste de los modelos predictivos elaborados para describir las respuestas crecimiento observadas de *L. mesenteroides* se realizará mediante representaciones gráficas y por una serie de estadísticos e índices matemáticos como son: la raíz del error cuadrático medio (*RMSE*), el coeficiente de regresión múltiple (R^2) y los índices sesgo (B_f) y exactitud (A_f).

4.2.5.1. Validación matemática

La validación de los modelos predictivos elaborados se llevará a cabo en diversas fases. En primer lugar se realizará la *validación matemática*, utilizando los valores de los parámetros de crecimiento (μ_{max} , λ e y_{End}) obtenidos a partir de condiciones experimentales adicionales a las del diseño (Tabla 8). El método seguido para obtener dichos valores ha sido el mismo que el descrito para el modelo, es decir, la obtención de curvas de crecimiento en caldo MRS de *L. mesenteroides* a partir de medidas de absorbancia en el analizador Bioscreen C.

4.2.5.2. Validación en productos cárnicos

La siguiente etapa en la validación de los modelos predictivos será la validación en el alimento naturalmente contaminado, es decir, con su carga microbiana natural, estudios éstos ya citados en diversos trabajos científicos en productos cárnicos cocidos o carne (Devlieghere y col., 2000; Lebert y col., 2000).

Para la validación, se compararán las predicciones de crecimiento de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, obtenidas mediante los modelos elaborados, con los valores del crecimiento BAL en productos cárnicos cocidos y envasados al vacío (jamón, pechuga de pavo y pechuga de pollo). Las curvas de crecimiento en función del

tiempo de análisis obtenidas se ajustaron a la fórmula de Gompertz (Gibson y col., 1988) o Baranyi y Roberts (1994) mediante el programa DMFit.

Tabla 8. Condiciones adicionales utilizadas para la validación matemática de modelos predictivos de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*

<i>Temperatura</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)
10.5	6.5	0.25	50
10.5	6.5	1.75	0
10.5	6.5	1.75	50
10.5	6.5	1.75	100
10.5	6.5	3.25	0
10.5	6.5	3.25	50
10.5	6.5	3.25	100
14	7	1.75	0
14	7	4.75	0
17.5	6.5	0.25	50
17.5	6.5	1.75	50
17.5	6.5	1.75	100
17.5	6.5	3.25	50
17.5	6	1.75	50
17.5	6	3.25	50
17.5	7	3.25	50
21	6	3.25	50
21	7	3.25	50
21	6	0.25	0
21	6	1.75	0
24.5	6.5	3.25	100
24.5	6.5	3.25	50
24.5	6.5	3.25	150
24.5	6	1.75	150
24.5	6	4.75	50
24.5	6	4.75	150
24.5	7	4.75	50
24.5	7	4.75	150

Para los parámetros cinéticos fase de adaptación y tasa de crecimiento, los valores observados se compararán directamente a los valores estimados por los modelos predictivos. Sin embargo, para el parámetro densidad máxima de población será necesario transformar los datos observados de recuento microbiano en absorbancia mediante una recta de calibrado, para que puedan ser comparados con los valores predictivos. Para obtener la recta de calibrado se realizó un estudio en el que se inocularon en caldo MRS distintas diluciones de inóculo de *L. mesenteroides* y se determinó la absorbancia (DO) mediante el analizador Bioscreen C. Paralelamente se realizó en agar MRS el recuento en placa (Log ufc/g) de las mismas diluciones microbianas introducidas en el Bioscreen. Posteriormente se calculó la recta de calibrado, enfrentando los valores de absorbancia a los valores de recuento, en el rango en el cual la relación entre la absorbancia y el recuento es lineal.

4.2.5.3. Validación en jugo de productos cárnicos

A continuación se realizará la validación en jugo de los productos cárnicos, comparando los valores de μ_{max} , λ e y_{End} estimados por los modelos, con los observados para *L. mesenteroides* inoculado en el jugo de los tres productos cárnicos estudiados (jamón cocido, pechuga de pavo y pechuga de pollo). Este tipo de estudios ya han sido realizados por varios autores para microorganismos patógenos y alterantes en diversos alimentos (Lack y col., 1997; Devlieghere y col., 1998; Valero y col., 2003).

A partir de cada producto se tomaron muestras con un peso de 20 g cada una, a las que se añadió 180 ml de solución salina y se trituró y mezcló con el Stomacher. A continuación se filtró la solución resultante con papel de filtro con el fin de obtener un caldo en el que no existiera exceso de partículas en suspensión y que de este modo no existieran interferencias en las medidas de absorbancia. El filtrado fue distribuido en tubos de 9 ml cada uno y esterilizados en autoclave (121°C durante 15 min.) para destruir la carga microbiana natural de los productos cárnicos, de forma que no compitan en el crecimiento de *L. mesenteroides* 219. Una vez estéril, parte de los tubos con el jugo del alimento fueron inoculados con dicho microorganismo de forma que la concentración final fuera próxima a 10^5 ufc/ml, mientras que otra parte fueron reservados para ser utilizados como blancos.

En cada pocillo de las placas del analizador Bioscreen C se transfirieron 250 μ l del jugo del alimento ya inoculado, siendo 4 las réplicas para cada temperatura de incubación, que fueron las mismas que las estudiadas para elaborar el modelo predictivo. Además, se reservaron pocillos a los que se les añadió 250 μ l del jugo sin inocular que sirvieron como control o blanco para cada tipo de alimento. Una vez obtenidas las medidas de absorbancia, los valores de los blancos fueron restados a los valores del jugo inoculado para cada tiempo y de este modo eliminamos el efecto de las características del medio de cultivo (color, partículas, etc.) sobre la densidad óptica, centrándonos exclusivamente en el crecimiento que describe *L. mesenteroides* en este tipo de productos cárnicos.

Para simular las condiciones de anaerobiosis la mitad de los pocillos se recubrieron con 200 μ l de parafina líquida y de este modo obtener curvas bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis para validar los modelos predictivos.

Posteriormente, los valores de absorbancia obtenidos del crecimiento de *L. mesenteroides* fueron ajustados a la función de Baranyi y Roberts (1994), opción 3 por medio del programa DMFit. Como resultado se obtuvieron los parámetros cinéticos tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y asíntota superior (y_{End}) que fueron comparados con los estimados por los modelos predictivos.

4.2.5.4. Validación con datos de la literatura

Los modelos predictivos de *L. mesenteroides* elaborados serán validados comparando los valores de crecimiento estimados con los valores observados en otros alimentos y medios de cultivo, recogidos en diversas publicaciones científicas. Para seleccionar los datos de la literatura se tendrá en cuenta que los factores ambientales (T, pH, NaNO₂, etc) estén dentro de los rangos estudiados en nuestro diseño experimental (Tabla 7).

4.2.5.5. Validación FMM

Finalmente se realizará una validación de los modelos a partir de los datos que nos proporcionan ciertos programas informáticos como *Food MicroModel* versión 3.02 (FMM, Leatherhead Food Research Association, Leatherhead, U. K.) para

Lactobacillus plantarum, como microorganismo perteneciente al grupo de BAL al que también pertenece *L. mesenteroides*. La serie de condiciones de crecimiento utilizadas para establecer estas comparaciones son las mismas que las propuestas por el diseño (Tabla 7).

4.2.6. Aplicación de los modelos predictivos

4.2.6.1. Determinación del periodo de vida comercial

4.2.6.1.1. Vida comercial observada

Se ha realizado el análisis sensorial de las muestras de los productos cárnicos cocidos estudiados (pollo, pavo y jamón cocidos), para posteriormente calcular la calidad sensorial global que es lo que determinará la vida comercial observada.

Análisis sensorial de las muestras

El análisis organoléptico de las muestras se realizó durante un periodo máximo de 51 días, paralelamente al análisis microbiológico, teniendo en cuenta como atributos más destacables, el color, aspecto, olor, sabor y presencia de limo. Basándonos en la Escala de Karlsruhe (Witting de Penna, 1981; Anzaldúa-Morales, 1994), con valores entre un máximo de 9 y un mínimo de 1, se fijó el valor de 5 como el inicio del deterioro del producto, y por tanto, el rechazo del producto se produjo cuando el valor asignado fue igual o inferior a 5.

Tipo de prueba

El análisis sensorial en nuestro estudio se llevó a cabo mediante una prueba descriptiva cuantitativa (QDA), en la que se evaluaron las características sensoriales y se puntuó la aceptación general. Se desarrolló un glosario de términos que se relacionan con una escala de intensidad, y se utilizó el análisis estadístico de regresión y varianza para estimar la significación de las diferencias entre muestras y jueces, como establece la Norma Española UNE 87-008-92 (1997) y otros autores (Witting de Penna, 1981).

Jueces

Hemos contado con “jueces entrenados” o “catadores” en un número de 6 a 10 jueces en cada sesión de evaluación organoléptica (Anzaldúa-Morales, 1994; Norma Española UNE 87-001-94, 1997; Norma Española UNE 87-008-92, 1997). Los jueces seleccionados poseían habilidad para la detección de propiedades sensoriales, y estaban habituados a realizar pruebas sensoriales con cierta periodicidad. Además fueron entrenados específicamente para conocer las características óptimas del producto, sus principales defectos y procesos de alteración, como así también cómo utilizar de forma correcta las escalas y las fichas empleadas durante el examen organoléptico. A la hora de seleccionar a los componentes de nuestro grupo de trabajo se escogió personal del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, teniendo en cuenta criterios como la habilidad, el interés, la capacidad de trabajo, etc., y sobre todo la disponibilidad de tiempo (Civille y Szczesniak, 1973; Larmond, 1977).

En un momento determinado del estudio se introdujeron muestras “control” (muestras cuyas características eran las más óptimas, aceptación igual a 9) para determinar la variabilidad en la apreciación de cada juez y así determinar su habilidad y consistencia (Costell y Durán., 1981).

Condiciones de prueba

Todos los factores o circunstancias que rodearon al análisis de las muestras y que pudieran influir en la apreciación del juez fueron controlados.

De esta forma, el número de muestras por sesión para cada catador fue igual o inferior a cinco, para evitar la fatiga (Larmond, 1977). Se sirvieron en el horario apropiado, entre las 11 y 13 horas (Anzaldúa-Morales y col., 1983; Anzaldúa-Morales y col., 1987) y a una temperatura próxima a la que se consume el producto, alrededor de 10°C. Las muestras se presentaron codificadas mediante claves de tres cifras para evitar el error de expectación, ya que el juez podría puntuar una muestra en relación con lo “esperado”, al asociarlo inconscientemente con el número asignado a la muestra. Por ejemplo, la muestra con el número 1 podría ser interpretada como “lo mejor” (Anzaldúa-Morales, 1994). Asimismo, fueron presentadas en orden aleatorio, evitando así el efecto de contraste que consiste en puntuar por exceso o por defecto una muestra en función de la anterior. Por ejemplo, si los jueces prueban una muestra desagradable

después de otra que les gusta, esto puede suponer que puntúen a la segunda por debajo de la realidad (Larmond, 1977). Los catadores realizaron sus valoraciones con calma y tranquilidad, para evitar la introducción de errores en el estudio. Además estuvieron ubicados en cabinas individuales, evitando así el efecto de sugestión, ya que las reacciones y expresiones del resto de jueces podrían influirles en su apreciación (Larmond, 1977) y se les suministró agua para beber entre muestra y muestra, con el fin de que el sabor de una de ellas no interfiera en el sabor de la siguiente.

Sala de cata

Las condiciones básicas de la sala de cata utilizada en nuestro estudio vienen definidas por diversos autores (Anzaldúa- Morales, 1994; Norma Española UNE 87-004-79, 1997), de forma que ninguna circunstancia externa pueda influir en las valoraciones de los catadores. Así pues el local era espacioso, de fácil limpieza, aislado de fuentes de ruido y con un color liso claro neutro en las paredes, con una iluminación uniforme y regulable; la ventilación era adecuada, evitando cualquier tipo de interferencia en la apreciación del olor en las muestras objeto de estudio, debido a olores extraños y la temperatura y estado higrométrico agradables, entre 20-22°C y 60-70% de humedad relativa.

Cabinas

Las características se establecen en la Norma Española UNE 87-004-79 (1997) y de esta forma todas las cabinas eran de material de fácil conservación y limpieza, idénticas entre sí y estaban separadas unas de otras por mamparas para aislar a los catadores. La iluminación de la cabina era individual y regulable en dirección, intensidad y color. En una zona de la mesa estaba dispuesta una pila dotada de agua corriente potable y en el panel delantero había un dispositivo a modo de trampilla para facilitar la presentación de las muestras.

En nuestro caso hemos utilizado las instalaciones del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, las cuales reúnen las características citadas anteriormente.

Atributos sensoriales

- Color
- Aspecto
- Olor
- Sabor
- Limo/viscosidad
- Aceptación general

En el momento de realizar el análisis de las distintas muestras, se presentó a los catadores un cuestionario (Tabla 9) con una escala numerada entre un máximo de 9 y un mínimo de 1, para anotar la valoración de todas las características anteriormente citadas. El color, aspecto y presencia de limo fueron evaluados antes de abrir el envase, mientras que la evaluación de olor y sabor se realizó una vez abierto, coincidiendo con la metodología llevada a cabo por otros autores (Kotzekidou y Bloukas, 1996). El olor se valoró directamente desde el envase, mientras que para el sabor, las muestras identificadas por una clave codificada, fueron presentadas en un plato para facilitar la labor al catador. Al mismo tiempo, se les presentó una tabla de valoración de los atributos de los tres productos cárnicos (Tablas 10a,b,c), donde se detallan las características específicas de cada alimento en relación con la escala numérica.

En el caso del olor cabía la posibilidad de realizar la evaluación inmediatamente después de abrir el envase y transcurridos 15 minutos; finalmente nos hemos decantado sólo por la primera opción, ya que hay estudios según los cuales no existen diferencias significativas entre los resultados de ambas percepciones (Otremba y col., 1999).

Tabla 9. Cuestionario de puntuación de las muestras

JUEZ: _____ FECHA: _____
 PRODUCTO: _____

Puntúe las siguientes muestras, tachando el valor asignado a cada atributo según su criterio.

ESCALA de ATRIBUTOS:

{	Limo	9	8	7	6	5	4	3	2	1
	Nulo									
{	Resto	9	8	7	6	5	4	3	2	1

N° MUESTRA			9	8	7	6	5	4	3	2	1
	Antes de abrir	COLOR									
		ASPECTO									
		OLOR									
	Abierto	SABOR									
		LIMO									
	Aceptación general										

Tabla 10a. *Atributos sensoriales de jamón cocido.*

Atributos	Excelente 9	Muy buena 8	Buena 7	Satisfactoria 6	Regular 5	Suficiente 4	Defectuosa 3	Mala 2	Muy mala 1
COLOR	Excepcionalmente agradable. Brillante. Típico. Tonalidades rosáceas claras.	Agradable. Típico. Brillante.	Típico. Brillante. Algo descolorido, hasta rosa pálido.	Aún típico. Bordes sin brillo. Color alterado: muy pálido, muy irregular, con zonas oscuras.	Aún típico. Sin brillo. Manchas iridiscentes anaranjadas, verdosas, grises, opacas.	Poco típico. Algunas manchas rojo oscuro. Abundantes manchas iridiscentes.	Atípico. Intensamente teñido o muy descolorido. Manchas abundantes: grises, rojas, verdosas, iridiscentes, azuladas	Atípico. Artificial. Deteriorado.	Completamente artificial. Muy deteriorado.
ASPECTO	Completamente bien conservada.	Muy bien conservada. Algunos poros.	Bien conservada. Algunas perforaciones.	Aún conservada. Perforaciones.	Poco compacta. Muy diferenciados los trozos de carne. Perforaciones grandes.	Poco compacta. No es desagradable. Muchos huecos.	No compacta. Zonas fácilmente separables. Huecos.	Muy heterogénea. Desagradable.	Muy desagradable.
OLOR	Específico. Excepcionalmente agradable. Pronunciado. Muy bueno.	Específico. Agradable. Bueno. Intenso.	Específico. Agradable. Poco intenso.	Levemente perjudicado. Tenue. Más intenso en algunas zonas.	Atípico (a cecinas = carne salada y seca). Daño del olor propio aceptable.	Atípico. Algo dañado: quemado, añejo, rancio, intenso, picante, a humo, amoniacal.	No típico. Completamente disminuido. Claramente alterado, rancio, fermentado.	Muy alterado. Desagradable. Putrefacto. Fermentado.	Francamente deteriorado. Repugnante.
SABOR	Específico. Típico. Intenso. Excepcionalmente agradable. Muy bueno.	Típico. Bueno.	Típico.	Levemente perjudicado. Sabor aún agradable.	Daño del sabor propio, aún aceptable. Poco específico (a cecinas)	Claramente dañado: añejo, a quemado, rancio, picante, amoniacal, disminuido.	Alterado. Muy disminuido. Rancio.	Muy alterado. Desagradable. Rancio. Fermentado.	Extraño. Desagradable. Putrefacto.
LIMO / VISCOSIDAD	Nulo		Cantidad escasa		Cantidad moderada		Abundante		Muy abundante

Tabla 10b. *Atributos sensoriales de pechuga de pavo cocida.*

Atributos	Excelente 9	Muy buena 8	Buena 7	Satisfactoria 6	Regular 5	Suficiente 4	Defectuosa 3	Mala 2	Muy mala 1
COLOR	Excepcionalmente agradable. Típico. Tonalidades rosáceas claras.	Agradable. Típico.	Típico. Algo descolorido, hasta rosa pálido.	Aún típico. Color alterado: muy pálido, muy irregular, con zonas oscuras.	Aún típico. Manchas iridiscentes anaranjadas, verdosas, grises, opacas.	Poco típico. Algunas manchas rojo oscuro. Abundantes manchas iridiscentes.	Atípico. Intensamente teñido o muy descolorido. Manchas abundantes: grises, rojas, verdosas, iridiscentes, azuladas	Atípico. Artificial. Deteriorado.	Completamente artificial. Muy deteriorado.
ASPECTO	Completamente bien conservada.	Muy bien conservada. Algunos poros.	Bien conservada. Algunas perforaciones.	Aún conservada. Perforaciones.	Poco compacta. Muy diferenciados los trozos de carne. Perforaciones grandes.	Poco compacta. No es desagradable. Muchos huecos.	No compacta. Zonas fácilmente separables. Huecos.	Muy heterogénea. Desagradable	Muy desagradable.
OLOR	Específico. Excepcionalmente agradable. Pronunciado. Muy bueno.	Específico. Agradable. Bueno. Intenso.	Específico. Agradable. Poco intenso.	Levemente perjudicado. Tenue. Más intenso en algunas zonas.	Atípico (a cecinas = carne salada y seca). Daño del olor propio aceptable.	Atípico. Algo dañado: quemado, añejo, rancio, intenso, picante, a humo, amoniacal.	No típico. Claramente alterado, rancio, fermentado.	Muy alterado. Desagradable . Putrefacto. Fermentado.	Francamente deteriorado. Repugnante.
SABOR	Específico. Típico. Intenso. Excepcionalmente agradable. Muy bueno.	Típico. Bueno.	Típico.	Levemente perjudicado. Sabor aún agradable.	Daño del sabor propio, aún aceptable. Poco específico (a cecinas)	Claramente dañado: añejo, a quemado, rancio, picante, amoniacal..	Alterado. Rancio.	Muy alterado. Desagradable . Rancio. Fermentado.	Extraño. Desagradable. Putrefacto.
LIMO / VISCOSIDAD	Nulo		Cantidad escasa		Cantidad moderada		Abundante		Muy abundante

Tabla 10c. *Atributos sensoriales de pechuga de pollo cocida.*

Atributos	Excelente 9	Muy buena 8	Buena 7	Satisfactoria 6	Regular 5	Suficiente 4	Defectuosa 3	Mala 2	Muy mala 1
COLOR	Excepcionalmente agradable. Típico. Tonalidades rosáceas claras.	Agradable. Típico.	Típico. Algo descolorido, hasta rosa pálido.	Aún típico. Color alterado: muy pálido, muy irregular, con zonas oscuras.	Aún típico. Manchas iridiscentes anaranjadas, verdosas, grises, opacas.	Poco típico. Algunas manchas rojo oscuro. Abundantes manchas iridiscentes.	Atípico. Intensamente teñido o muy descolorido. Manchas abundantes: grises, rojas, verdosas, iridiscentes, azuladas	Atípico. Artificial. Deteriorado.	Completamente artificial. Muy deteriorado.
ASPECTO	Completamente bien conservada.	Muy bien conservada. Algunos poros.	Bien conservada. Algunas perforaciones.	Aún conservada. Perforaciones.	Poco compacta. Muy diferenciados los trozos de carne. Perforaciones grandes.	Poco compacta. No es desagradable. Muchos huecos.	No compacta. Zonas fácilmente separables. Huecos.	Muy heterogénea. Desagradable.	Muy desagradable.
OLOR	Específico. A especias. Excepcionalmente agradable. Pronunciado. Muy bueno.	Específico. A especias. Agradable. Bueno. Intenso.	Específico. A especias. Agradable. Poco intenso.	Levemente perjudicado. Tenue. Más intenso en algunas zonas.	Atípico (a cecinas = carne salada y seca). Daño del olor propio aceptable.	Atípico. Algo dañado: quemado, añejo, rancio, intenso, picante, a humo, amoniacal.	No típico. Claramente alterado, rancio, fermentado.	Muy alterado. Desagradable. Putrefacto. Fermentado.	Francamente deteriorado. Repugnante.
SABOR	Específico. Típico. Intenso. Excepcionalmente agradable. Muy bueno.	Típico. Bueno.	Típico. A especias.	Levemente perjudicado. Sabor aún agradable.	Daño del sabor propio, aún aceptable. Poco específico (a cecinas)	Claramente dañado: añejo, a quemado, rancio, picante, amoniacal..	Alterado. Rancio.	Muy alterado. Desagradable. Rancio. Fermentado.	Extraño. Desagradable. Putrefacto.
LIMO / VISCOSIDAD	Nulo		Cantidad escasa		Cantidad moderada		Abundante		Muy abundante

Calidad sensorial global

Para la determinación del tiempo de vida comercial del producto se calculó la *Calidad sensorial global*. Para estimar la calidad sensorial global (Q), los promedios de cada uno de los atributos (p_i) fueron multiplicados por un factor (f_i), según el grado de importancia atribuida por el panel de catadores, usando la fórmula dada por Witting de Penna (1981).

$$Q = \sum (p_i \times f_i) / \sum f_i \quad (34)$$

Posteriormente los datos fueron ajustados a una regresión polinómica para la estimación de la vida comercial.

4.2.6.1.2. Vida comercial predictiva

A partir de los valores estimados para los parámetros cinéticos λ , μ_{max} e y_{End} por los modelos secundarios elaborados, se calculó la vida media predictiva de los productos cárnicos cocidos mediante la fórmula desarrollada por Baranyi y Roberts (1994):

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} A(t) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{max} A(t)} - 1}{e^{y_{max} - y_0}} \right) \quad (35)$$

donde $y(t)$ es el logaritmo natural de la concentración celular, y_0 es el logaritmo neperiano de la concentración celular inicial, μ_{max} es la tasa máxima específica de crecimiento, y_{max} es la concentración celular máxima (fase estacionaria) y $A(t)$ es

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \ln (e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{-vt-h_0}) \quad (36)$$

siendo $v = \mu_{max}$ y $h_0 = \lambda v$, donde λ es la fase de adaptación y v es un factor de adaptación al nuevo ambiente.

Para calcular el valor estimado del parámetro y_{End} por los modelos predictivos, previamente será necesario transformar los valores observados del recuento de BAL, para los productos cárnicos, en valores de absorbancia mediante una recta de calibrado. Para obtener la recta se realizó un estudio, en condiciones cercanas a las óptimas de crecimiento (McClure y col., 1993b) de *L. mesenteroides*, en el que se inocularon en caldo MRS distintas diluciones de inóculo de este microorganismo y se determinó la absorbancia (DO) mediante el analizador Bioscreen C. Paralelamente se realizó en agar MRS el recuento en placa (Log ufc/g) de las mismas diluciones microbianas introducidas en el Bioscreen. Posteriormente se calculó la recta de calibrado, enfrentando los valores de absorbancia a los valores de recuento, en el rango en el cual la relación entre la absorbancia y el recuento es lineal.

Para el cálculo de la vida comercial predictiva, se definió este periodo como el tiempo transcurrido en alcanzarse los niveles 10^6 - 10^8 de BAL, criterio descrito por diversos autores (Korkeala y Alanko, 1988; García Gimeno y Zurera Cosano, 1997; Korkeala y Björkroth, 1997; García- Gimeno y col., 1998).

4.2.6.2. Formulación y desarrollo de nuevos productos

A partir de los modelos predictivos elaborados se hicieron predicciones acerca de las consecuencias sobre los parámetros cinéticos λ , μ_{max} o y_{End} cuando se realizan cambios en la formulación de los productos alimenticios. Las nuevas predicciones de crecimiento se realizaron dentro del intervalo de los factores ambientales estudiados, variando la concentración de NaCl, pH, etc.

4.2.7. Análisis estadístico

El análisis y tratamiento estadístico de los datos se realizó con los programas Microsoft Excel 97, Statistica v. 5 para Windows y SPSS 8.0 para Windows.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Evaluación microbiológica de los productos cárnicos

Tal y como se expuso en el apartado Material y Métodos, con el fin de establecer cual es el principal grupo de microorganismos alterantes en los productos cárnicos cocidos se ha realizado la monitorización y posterior identificación microbiana de *Brochothrix thermosphacta*, bacterias ácido lácticas y psicotrofas en jamón cocido, pechuga de pollo y pechuga de pavo.

De forma paralela, se controló la presencia de microorganismos patógenos según lo establecido por la legislación para este tipo de productos cárnicos. En ningún caso se aisló *Salmonella-Shigella*, Clostridios sulfito-reductores, *Staphylococcus aureus* ni *Enterobacteriaceae* dentro del periodo de estudio.

En el caso de levaduras y mohos, el desarrollo fue irregular y únicamente fueron aisladas en las muestras almacenadas a 17.7°C. Esto se explicaría debido a que estos microorganismos ven limitado su crecimiento al no competir bien con las bacterias a bajas temperaturas (Garriga y col., 1996; Huis in't Veld, 1996).

5.1.1. *Brochothrix thermosphacta*

El desarrollo de este microorganismo fue muy variable y esporádico, siendo únicamente representativo su crecimiento en el pavo cocido. En las muestras de pavo (Figura 7), *Brochothrix thermosphacta* creció a todas las temperaturas de estudio, excepto a la temperatura más baja, 2.3°C, lo cual se relaciona con el hecho de que este microorganismo no tiene especial ventaja para desarrollarse a bajas temperaturas (Newton y Gill, 1978). Para el resto de temperaturas, *Brochothrix thermosphacta* empezó a detectarse en las muestras al cabo de 72 h. para la temperatura de almacenamiento de 17.7°C, a las 168 h. para 10 y 13.5°C y a las 240 h. para 6.5°C. El nivel inicial fue cero para todas las temperaturas, mientras que el recuento máximo alcanzado durante el periodo de análisis fue próximo o superior a 10^7 ufc/g (Figura 7).

La velocidad de crecimiento fue más acusada conforme más elevada fue la temperatura de almacenamiento, 17.7°C, al situarse próxima a la óptima de crecimiento

del microorganismo, entre 20-25°C según diversos estudios (Collins- Thompson y Rodríguez -López, 1980; Sneath y col., 1991; McClure y col., 1993a).

En las restantes muestras estudiadas (jamón cocido y pechuga de pollo cocida) no se detectó la presencia de *Brochothrix thermosphacta* o bien los recuentos fueron muy irregulares, fenómenos observados por otros autores (Holley, 1997a; Holley, 1997b; López- Caballero y col., 1999; Samelis y col., 2000b; Susiluoto y col., 2003). Este hecho puede deberse a la inhibición causada por las BAL, debido a la competencia por el metabolismo de la glucosa entre ambos grupos microbianos (Newton y Rigg 1979), así como por la producción de ácido láctico que reduce el pH hasta valores inferiores a 5.5, a los cuales *B. thermosphacta* no crece (Collins- Thompson y Rodríguez- López, 1980; Mukherji y Qvist, 1981; Blickstad, 1983; Dykes y col., 1991). Para otros autores, el uso de materiales de envasado de baja permeabilidad al oxígeno puede contribuir a la supresión del crecimiento de este microorganismo en productos como bologna, jamón y pechuga de pavo cocida (Nielsen, 1983; Kotzekidou y Bloukas, 1996; Samelis y col., 2000b).

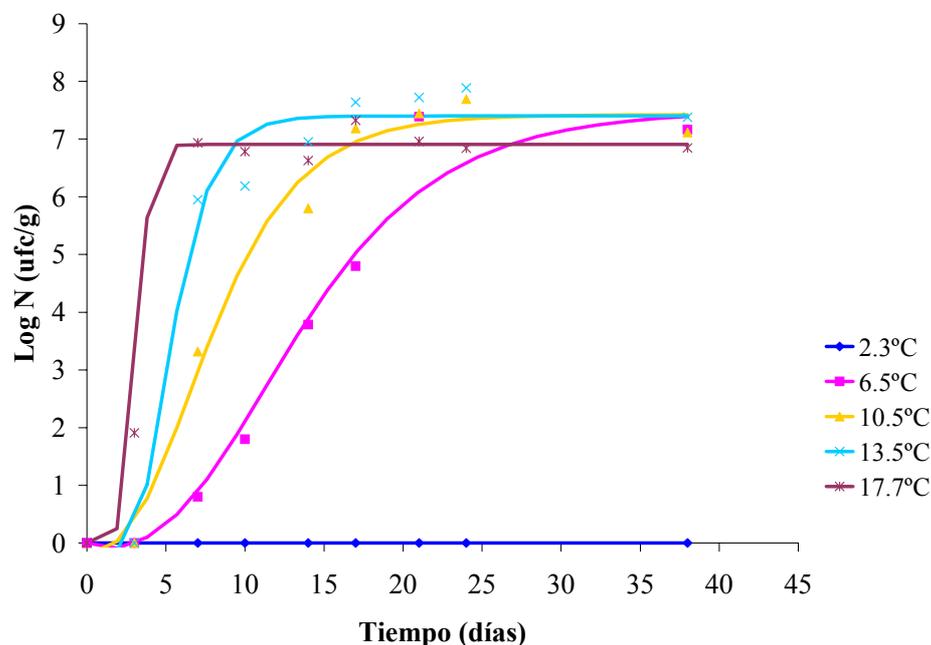


Figura 7. Curvas de crecimiento descritas por *Brochothrix thermosphacta* en pechuga de pavo cocida envasada al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

5.1.2. Bacterias psicrotrofas

Las bacterias psicrotrofas presentaron una evolución favorable en los tres tipos de productos cárnicos estudiados a todas las temperaturas de almacenamiento, hecho que se puede observar en las Figuras 8, 9 y 10. Existieron diferencias en los recuentos iniciales, variando entre 10^1 ufc/g en pavo y jamón cocido, y alrededor de 10^4 ufc/g que se observaron en las muestras de pollo cocido.

La fase de adaptación de las bacterias psicrotrofas fue similar en las muestras de pollo y pavo (aproximadamente 6- 8 días para las temperaturas más bajas); mientras tanto, en el jamón cocido este tiempo no se detectó a ninguna de las temperaturas de almacenamiento (Figuras 8, 9 y 10). La velocidad o tasa de crecimiento aumentó conforme se incrementaron las temperaturas de almacenamiento de las muestras. El desarrollo y crecimiento más acusado de los microorganismos psicrotrofos se produjo en el jamón y en el pollo, para los cuales se observó que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la velocidad de crecimiento a la misma temperatura de almacenamiento.

Los niveles máximos alcanzados por estos microorganismos fueron en general elevados, entre 10^7 - 10^8 ufc/g, aunque se observaron algunas diferencias en función de las temperaturas de almacenamiento. Así, los recuentos fueron cercanos o superiores a 10^7 ufc/g en el pavo cocido (Figura 8) y pollo cocido (Figura 10) y niveles superiores a 10^8 ufc/g observados en pollo cocido (Figura 9) para todas las temperaturas de estudio.

De entre los microorganismos psicrotrofos aislados en los tres productos cárnicos cocidos se identificaron bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* entre otras. Destaca la presencia de *Staphylococcus xylosum*, que fue aislado en los tres productos cárnicos y durante todo el periodo de análisis, con un 17% del total de las identificaciones. También destacan *Pseudomonas cepacia* en un 15% de los aislamientos en jamón y pollo cocido, (Gill y Badoni, 2002) así como *Staphylococcus sciuri* en un 11% en los mismos alimentos y *Staphylococcus lentus* identificado en jamón cocido en un 9%. Estos aislamientos coinciden con los trabajos realizados por diversos autores con productos cárnicos que presentaban defectos sensoriales (Bersani y col., 1991; Marin y col., 1992; Blanco y col., 1994; Stella y col., 2001).

Puede sorprender la presencia de alguno de estos microorganismos en los productos envasados al vacío, por tanto un ambiente anaerobio. Tal es el caso de *Pseudomonas* que, según recoge el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9 (Sneath y col., 1991) se trata de un microorganismo aerobio, en cuyo metabolismo respiratorio el oxígeno actúa como aceptor terminal del electrón; sin embargo, en algunos casos, el nitrato puede ser usado como un aceptor alternativo del electrón, permitiendo el crecimiento en anaerobiosis. Para otros autores, su presencia es dependiente del tipo de envases, ya que en aquellos cuya permeabilidad es elevada, tanto la tasa máxima como el número máximo alcanzado de *Pseudomonas spp.* se ven incrementados (Newton y Rigg, 1979).

En el caso de otros de los microorganismos aislados, *Staphylococcus spp.*, su presencia está justificada, ya que se trata de bacterias anaerobias facultativas.

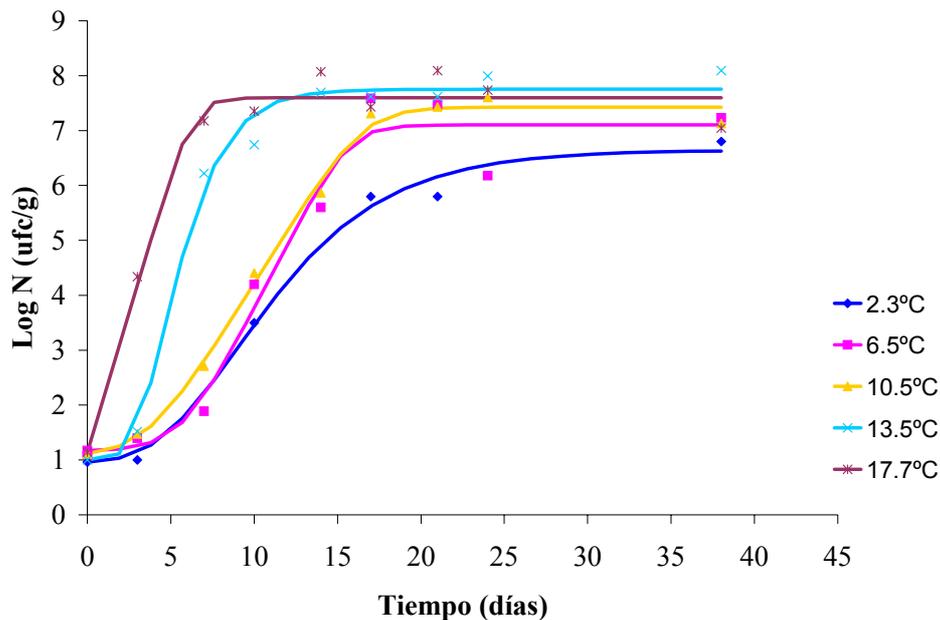


Figura 8. Curvas de crecimiento descritas por el grupo de bacterias psicrófilas en pechuga de pavo cocida envasada al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

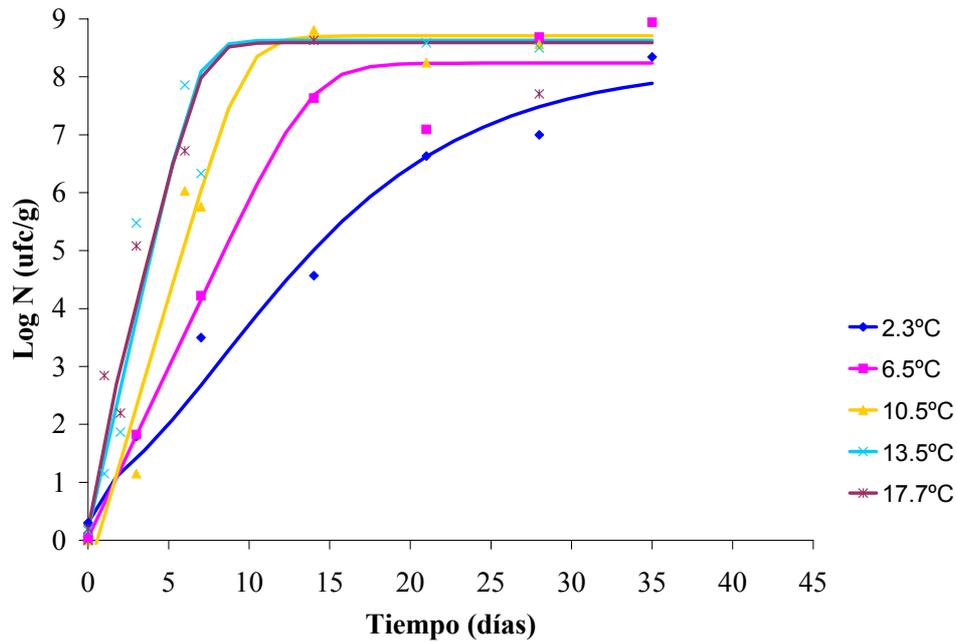


Figura 9. Curvas de crecimiento descritas por el grupo de bacterias psicrotrofas en jamón cocido envasado al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

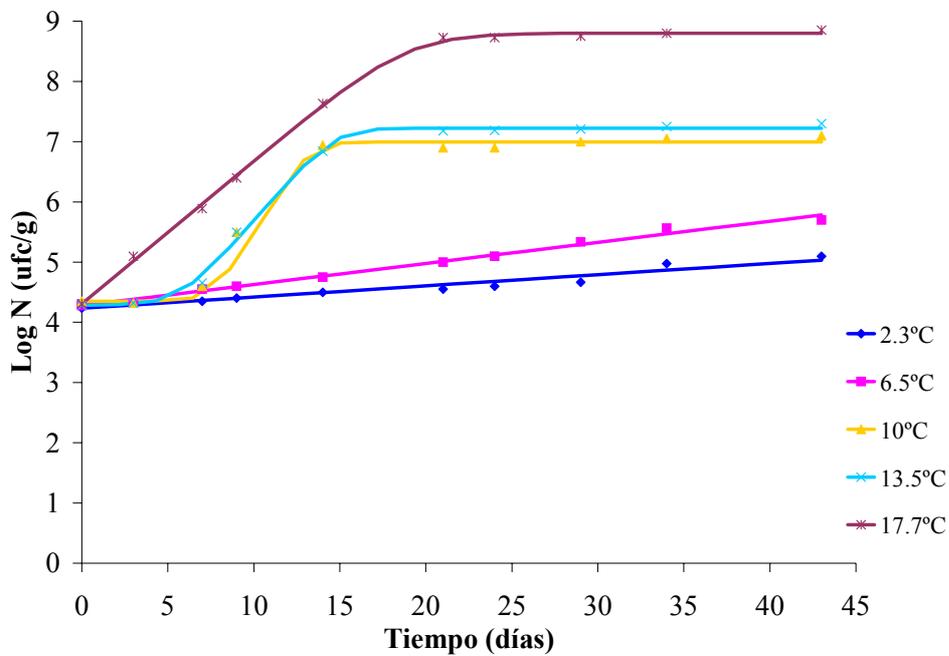


Figura 10. Curvas de crecimiento descritas por el grupo de bacterias psicrotrofas en pechuga de pollo cocida envasada al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

5.1.3. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se desarrollaron en todos los productos cárnicos de forma favorable, creciendo a todas las temperaturas de estudio (Figuras 11, 12 y 13). El nivel inicial varió de unos productos a otros, siendo cero en las muestras de pavo y jamón cocido, mientras que en el pollo fue superior a 10^4 ufc/g.

En todos los productos cárnicos se detectó fase de adaptación en el crecimiento de las BAL, siendo mayor en el pollo y pavo cocido que en el jamón (Figuras 11, 12, y 13). Así, a la temperatura más baja de nuestro estudio, 2.3°C , se observaron periodos de adaptación superiores a 13 días y 7 días en el pollo y pavo respectivamente, mientras que en el jamón este tiempo fue igual a 3 días. La velocidad o tasa de crecimiento aumentó conforme se incrementaron las temperaturas de almacenamiento de las muestras y de entre todos los alimentos, la velocidad fue más elevada en el jamón, seguido del pavo y por último del pollo. No obstante, entre los tres productos cárnicos se observó que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la velocidad de crecimiento a la misma temperatura de almacenamiento.

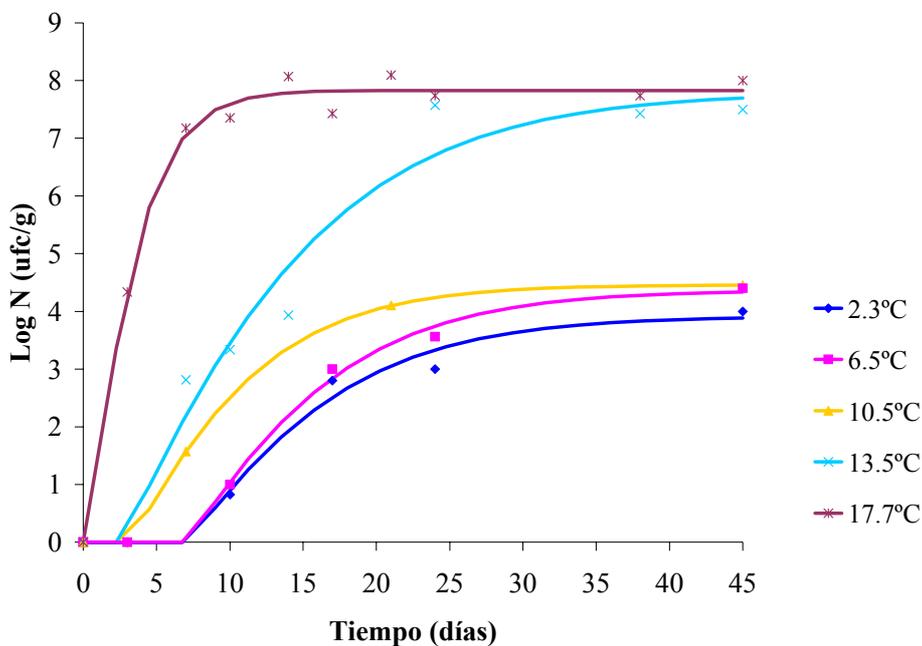


Figura 11. Curvas de crecimiento descritas por el grupo de bacterias ácido lácticas en pechuga de pavo cocida envasada al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

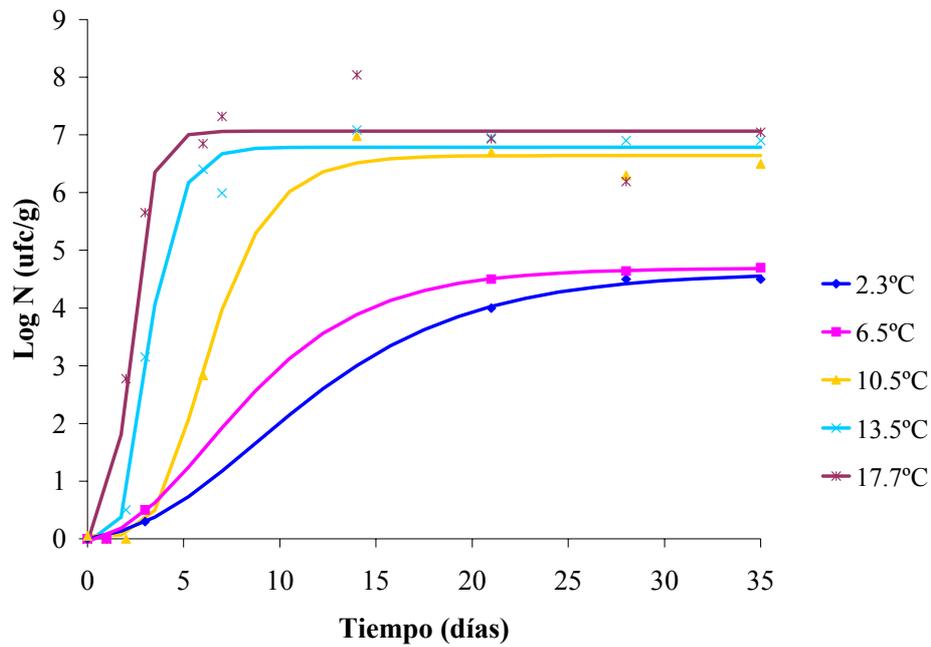


Figura 12. Curvas de crecimiento descritas por el grupo de bacterias ácido lácticas en jamón cocido envasado al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

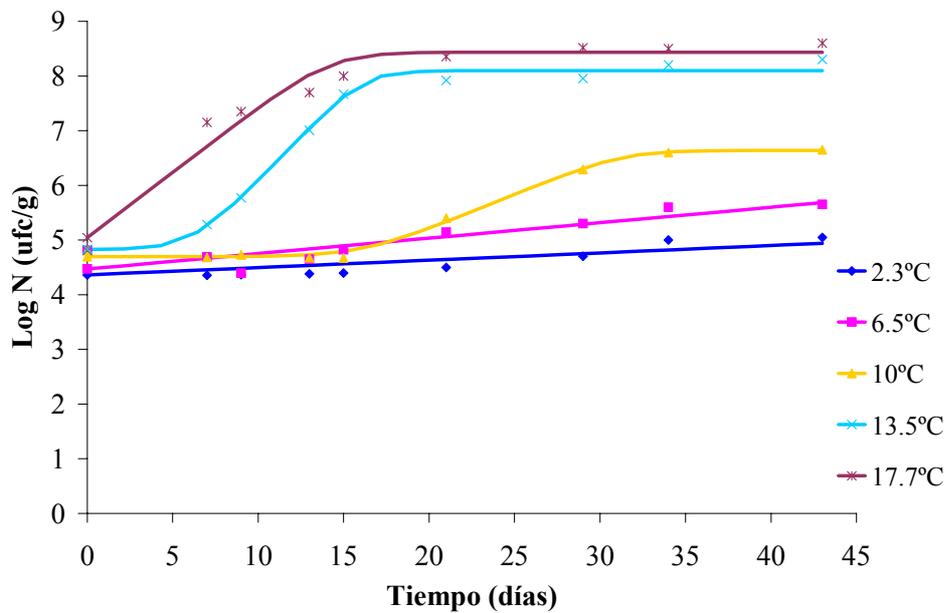


Figura 13. Curvas de crecimiento descritas por el grupo de bacterias ácido lácticas en pechuga de pollo cocida envasado al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

El recuento máximo alcanzado fue, en general, más elevado conforme se incrementó la temperatura de almacenamiento. De esta forma, a las temperaturas más elevadas, 17.7 y 13.5°C, el nivel fue 10^7 - 10^8 ufc/g en los tres alimentos, mientras que para las temperaturas más reducidas, el recuento final alcanzado fue alrededor de 10^4 ufc/g. Los niveles alcanzados al final del periodo de análisis coinciden con los resultados obtenidos por otros autores en similares productos cárnicos procesados (Collins- Thompson y Rodríguez- López, 1980; Beumer y col., 1996; Holley y McKellar, 1996; Holley, 1997a, b; López- Caballero, 1999; Anifantaki y col., 2002; Gill y Badoni, 2002). El importante crecimiento de las BAL es explicado por el estímulo que supone para estos microorganismos el ambiente enriquecido en CO₂, que se va creando en el envase a vacío tras el consumo del oxígeno residual por el metabolismo microbiano (Waites, 1988).

De los aislamientos e identificaciones realizadas en los tres productos cárnicos cocidos, dentro del grupo de BAL destacan los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*. De todas ellas, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* fue la especie más frecuentemente aislada, con un 54% del total de los aislamientos, predominando en jamón y pollo cocido, a todas las temperaturas de almacenamiento y a lo largo de la totalidad del periodo de estudio. Este microorganismo ha sido identificado también en otros estudios llevados a cabo en productos cárnicos similares (Collins- Thompson y Rodríguez López, 1980; Korkeala y col., 1988; Dykes y col., 1994a, b; Dykes y col., 1995; Beumer y col., 1996; Holley y col., 1996; Tsakalidou y col., 1997; Björkroth y col., 1998; Samelis y col., 1998; Zhang y Holley, 1999; Samelis y col., 2000a, b; Anifantaki y col., 2002; Susiluoto y col., 2003). Otras especies identificadas en los tres productos han sido principalmente *Lactobacillus paracasei paracasei* 1 (13%), *Lactococcus lactis lactis* 1 (8%), *Lactobacillus fermentum* (8%) y *Lactobacillus brevis* 1 (8%). Estos resultados coinciden con otros estudios realizados con carne o productos cárnicos los cuales mostraban signos de alteración (Collins- Thompson y Rodríguez López, 1980; Papa, 1988; Cantoni y col., 1992, Aulik, 1994; Beumer y col., 1996; Houtsma y col., 1996; Sameshima y col., 1997; Bersani y col., 1999; Shearer y col., 2002).

Según lo observado en todos los experimentos llevados a cabo en los tres tipos de productos cárnicos cocidos, hemos destacado al microorganismo *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* del grupo de bacterias ácido lácticas como

representante y principal responsable de la alteración de este tipo de alimentos, en detrimento de los microorganismos psicrotrofos. Esta decisión se ha tomado en base al predominio y alta frecuencia de aislamiento de *L. mesenteroides* (54% del total de los aislamientos de BAL) y a su presencia en los tres productos cárnicos. Sin embargo, las bacterias psicrotrofas se aislaron con menor frecuencia (<17%) y las especies aisladas fueron diferentes según el producto cárnico. De forma adicional, la elección de *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* se ha corroborado con numerosos estudios científicos, los cuales describen a este microorganismo como alterante de diversos tipos de productos cárnicos (Holley y col., 1996; Samelis y col., 2000a, b; Anifantaki y col., 2002; Susiluoto y col., 2003). Por todo esto, este microorganismo ha sido seleccionado en nuestro estudio para la elaboración de modelos predictivos de crecimiento en productos cárnicos cocidos, suponiendo además un aporte novedoso en la microbiología predictiva, ya que no existen modelos matemáticos en la literatura en relación con *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*.

5.2. Elaboración de modelos predictivos de crecimiento microbiano

Los modelos predictivos de crecimiento desarrollados para *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* han sido elaborados directamente a partir de las lecturas de absorbancia obtenidas en el analizador Bioscreen C, ya que existen numerosas referencias y estudios que demuestran que el método turbidimétrico es una herramienta rápida, válida y precisa para la recogida de datos de crecimiento microbiano y a partir de éstos, elaborar modelos predictivos de microorganismos patógenos y alterantes (Dalgaard y col., 1997; Neumeyer y col., 1997a; Nerbrink y col., 1999; Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Castillejo, 2002).

En nuestro estudio, las medidas de absorbancia recogidas con la ayuda del Bioscreen C se calibraron a concentración celular (Log N, ufc/ml) medidas por recuento en placa. La recta de calibrado, obtenida en condiciones cercanas a las óptimas de crecimiento (McClure y col., 1993b) de *L. mesenteroides* fue:

$$\text{Log } N = 2.9793x \text{ ABS} + 7.2884 \quad R^2 = 0.958$$

El intervalo de absorbancia donde se observó una relación lineal entre las medidas de densidad óptica y el logaritmo de la concentración de células fue 0.05-0.347, el cual se corresponde con una nivel celular de *L. mesenteroides* de 7.4- 8.28 (log ufc/ml).

Existen numerosos trabajos (Nerbrink y col., 1999; Barco, 2001; Castillejo, 2002) en donde los parámetros cinéticos calculados directamente a partir de los valores de absorbancia son comparados con los obtenidos a través transformaciones a recuento en placa mediante una recta de calibrado elaborada previamente, expresando de esta forma el crecimiento microbiano como $\text{Log}_{10} N$ de la concentración celular para cada tiempo. En estos estudios se observa una buena relación lineal, próxima a la unidad, entre los parámetros cinéticos calculados a partir de la absorbancia y los calculados a partir del recuento. De este modo, Dalgaard y col. (1994) observaron un valor de la relación $\mu_{\text{REC}}/\mu_{\text{ABS}}$ de 1.14 para *S. aureus* y 1.12 en un estudio llevado a cabo con *L. monocytogenes* por Nerbrink y col. (1999). A su vez, Neumeyer y col. (1997a) encontraron para el tiempo de generación una relación $\text{GT}_{\%T}/\text{GT}_{\text{REC}}$ de 1.50 para *Pseudomonas*, trabajando con datos expresados en transmitancia (%T). En otros estudios realizados en los últimos años, se han obtenido resultados similares; siendo la relación $\mu_{\text{REC}}/\mu_{\text{ABS}}$ 1.17 y 1.05 y la relación $\lambda_{\text{REC}}/\lambda_{\text{ABS}}$ 1.40 y 1.24 para *S aureus* en aerobiosis y anaerobiosis respectivamente (Castillejo, 2002).

5.2.1. Modelo primario

Los datos de absorbancia obtenidos mediante el analizador Bioscreen C, resultantes del crecimiento de *L. mesenteroides mesenteroides* en caldo de cultivo MRS, fueron ajustados mediante el programa informático DMFit a la ecuación de Baranyi y Roberts reparametrizada (1994), opción 3 del programa, recomendada en los casos en que los datos de origen no fueron recuentos microbianos y donde la magnitud de la unidad no influye en el ajuste (Pin, comunicación personal).

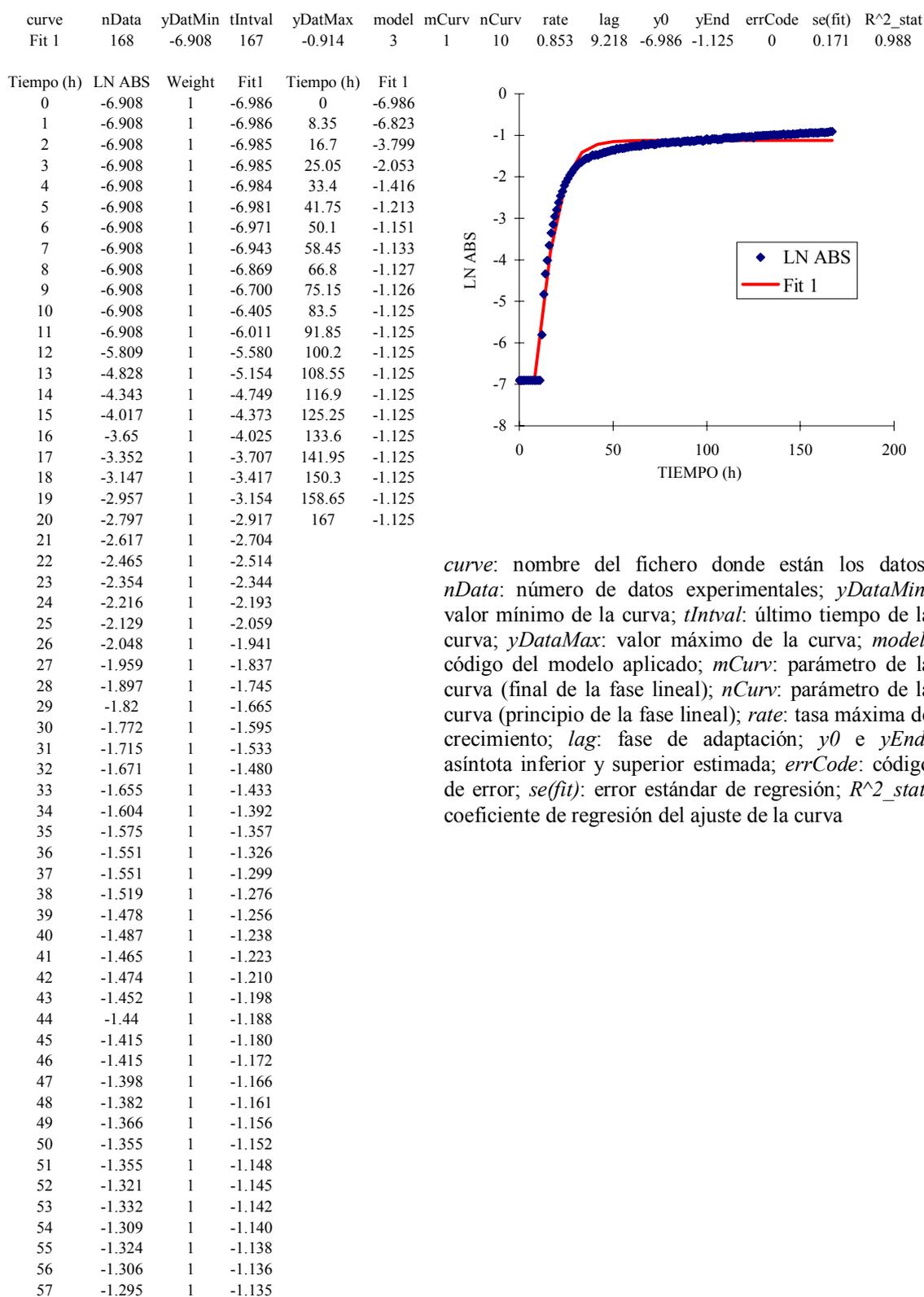


Figura 14. Ejemplo de curva de crecimiento y parámetros cinéticos obtenidos mediante el programa DMFit.

Tabla 11. Valores promedio observados de la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y densidad máxima de población (y_{End}) descrita por *L. mesenteroides* en medio de cultivo en aerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	μ_{max} (h^{-1})	λ (h)	<i>yEnd</i> (DO)
10.5	6.5	3.25	100	0.141	13.170	0.391
14	6	1.75	50	0.178	6.446	0.583
14	6	1.75	150	0.160	5.742	0.334
14	6	4.75	50	0.147	9.113	0.262
14	6	4.75	150	0.138	23.169	0.171
14	7	1.75	50	0.200	4.805	0.856
14	7	1.75	150	0.183	7.980	0.494
14	7	4.75	50	0.153	9.083	0.546
14	7	4.75	150	0.146	8.304	0.270
17.5	5.5	3.25	100	0.114	10.372	0.425
17.5	7.5	3.25	100	0.180	6.614	0.627
17.5	6.5	3.25	0	0.194	5.112	0.971
17.5	6.5	3.25	200	0.165	8.212	0.314
17.5*	6.5	3.25	100	0.177	6.579	0.453
17.5*	6.5	3.25	100	0.178	6.682	0.485
17.5*	6.5	3.25	100	0.176	6.709	0.514
17.5*	6.5	3.25	100	0.176	6.408	0.541
17.5*	6.5	3.25	100	0.176	6.233	0.565
17.5*	6.5	3.25	100	0.177	6.553	0.500
17.5	6.5	6.25	100	0.152	15.176	0.262
17.5	6.5	0.25	100	0.369	3.371	0.716
21	6	1.75	50	0.347	3.522	0.861
21	6	1.75	150	0.317	4.183	0.505
21	6	4.75	50	0.324	6.805	0.423
21	6	4.75	150	0.294	10.385	0.246
21	7	1.75	50	0.380	4.615	1.026
21	7	1.75	150	0.362	4.516	0.730
21	7	4.75	50	0.328	5.290	0.707
21	7	4.75	150	0.308	4.983	0.440
24.5	6.5	3.25	100	0.422	3.333	0.710

DO: unidades de densidad óptica

*: condiciones centrales

Tabla 12. Valores promedio observados de la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y densidad máxima de población (y_{End}) descrita por *L. mesenteroides* en medio de cultivo en anaerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	μ_{max} (h^{-1})	λ (h)	<i>yEnd</i> (DO)
10.5	6.5	3.25	100	0.106	16.919	0.382
14	6	1.75	50	0.161	7.535	0.706
14	6	1.75	150	0.149	7.855	0.286
14	6	4.75	50	0.139	12.446	0.297
14	6	4.75	150	0.120	21.743	0.094
14	7	1.75	50	0.180	6.571	0.978
14	7	1.75	150	0.168	7.854	0.487
14	7	4.75	50	0.142	12.817	0.617
14	7	4.75	150	0.130	11.168	0.305
17.5	5.5	3.25	100	0.103	12.914	0.544
17.5	7.5	3.25	100	0.169	6.122	0.824
17.5	6.5	3.25	0	0.191	5.335	1.028
17.5	6.5	3.25	200	0.157	9.419	0.233
17.5*	6.5	3.25	100	0.172	6.475	0.548
17.5*	6.5	3.25	100	0.172	6.602	0.529
17.5*	6.5	3.25	100	0.170	6.356	0.539
17.5*	6.5	3.25	100	0.176	6.498	0.537
17.5*	6.5	3.25	100	0.178	6.679	0.536
17.5*	6.5	3.25	100	0.167	6.063	0.542
17.5	6.5	6.25	100	0.141	14.864	0.269
17.5	6.5	0.25	100	0.363	3.589	0.632
21	6	1.75	50	0.336	3.793	0.783
21	6	1.75	150	0.312	4.259	0.366
21	6	4.75	50	0.323	9.088	0.371
21	6	4.75	150	0.269	12.648	0.129
21	7	1.75	50	0.363	3.630	1.049
21	7	1.75	150	0.337	4.272	0.634
21	7	4.75	50	0.313	5.880	0.696
21	7	4.75	150	0.296	5.301	0.367
24.5	6.5	3.25	100	0.409	3.658	0.480

DO: unidades de densidad óptica

*: condiciones centrales

En total, se obtuvieron 420 curvas de crecimiento, 210 para aerobiosis y las mismas para anaerobiosis, ya que se realizaron 7 réplicas por condición. Para cada una de las curvas se obtiene una hoja de cálculo como la mostrada en la Figura.14 donde quedan reflejados los parámetros de crecimiento, así como los valores predictivos que describen la curva modelada. Entre estos parámetros destacan la tasa máxima específica de crecimiento, el tiempo o fase de adaptación y la densidad máxima de población estimada (nivel microbiano al final del periodo experimental), que aparecen en la hoja de cálculo con las denominaciones “rate”, “lag” e “yEnd” respectivamente.

En las Tablas 11 y 12 aparecen los valores promedio observados para los parámetros cinéticos μ_{max} , λ e $yEnd$ en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis respectivamente.

En el centro del DCC se han realizado réplicas con el fin de proporcionar una estimación de la varianza experimental, no se observándose diferencias significativas ($p > 0.05$) cuando se compararon los valores de crecimiento observados de las réplicas experimentales en aerobiosis y anaerobiosis.

5.2.2. Efecto de los factores ambientales en el comportamiento de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*

Con el fin de determinar cuáles de los factores ambientales son los más influyentes en el desarrollo de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, se realizó un estudio estadístico mediante cálculo de matrices de correlación, basado en los datos resultantes del crecimiento de este microorganismo en las distintas condiciones estudiadas según el diseño experimental.

En las Tablas 13 y 14 se puede observar la correlación de los distintos factores ambientales sobre la μ_{max} de *L. mesenteroides* en aerobiosis y anaerobiosis respectivamente. En ambos casos, el factor más determinante en el crecimiento de este microorganismo es la temperatura, siendo la correlación significativa ($p < 0.01$). Los factores que siguen a la temperatura en influencia son la concentración salina y el pH. Cuando la temperatura y el pH aumentan se produce un incremento de la tasa máxima específica de crecimiento, mientras que cuando se aumentan la concentración de NaCl y NaNO₂ en el medio de cultivo, este parámetro de crecimiento disminuye.

Para el parámetro tasa de crecimiento, el valor más elevado fue $\mu_{max}= 0.422 \text{ h}^{-1}$ (T= 24.5°C, pH= 6.5, NaCl= 3.25, NaNO₂= 100, aerobiosis) y el más bajo fue $\mu_{max}= 0.103 \text{ h}^{-1}$ (T= 17.5°C, pH= 5.5, NaCl= 3.25, NaNO₂= 100, anaerobiosis) (Tablas 11 y 12).

Tabla 13. Matriz de correlación para la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}) de *L. mesenteroides* en condiciones de aerobiosis

	<i>T</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl</i>	<i>NaNO₂</i>	μ_{max}
<i>T</i> (°C)	1				
<i>pH</i>	0	1			
<i>NaCl</i> (%)	0	0	1		
<i>NaNO₂</i> (ppm)	0	0	0	1	
μ_{max} (h ⁻¹)	0.804**	0.121	-0.302	-0.087	1

** Correlación significativa en un nivel de 0.01

Tabla 14. Matriz de correlación para la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}) de *L. mesenteroides* en condiciones de anaerobiosis

	<i>T</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl</i>	<i>NaNO₂</i>	μ_{max}
<i>T</i> (°C)	1				
<i>pH</i>	0	1			
<i>NaCl</i> (%)	0	0	1		
<i>NaNO₂</i> (ppm)	0	0	0	1	
μ_{max} (h ⁻¹)	0.826**	0.105	-0.303	-0.103	1

** Correlación significativa en un nivel de 0.01

En cuanto a la fase de adaptación (λ), los factores de mayor influencia en el crecimiento de *L. mesenteroides* fueron la temperatura y la concentración de cloruro sódico, teniendo ambas un efecto significativo ($p < 0.01$), tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Tabla 15 y Tabla 16). Cuando hay un aumento de temperatura o pH, la fase de adaptación disminuye; sin embargo, cuando aumentan el nivel de sal o de nitritos se produce el efecto opuesto, es decir, este periodo de adaptación se ve incrementado.

La fase de adaptación presentó un valor máximo de $\lambda = 23.169 \text{ h}$ (T= 14°C, pH= 6, NaCl= 4.75, NaNO₂= 150, aerobiosis) y mínimo de $\lambda = 3.33 \text{ h}$ (T= 24.5°C, pH= 6.5, NaCl= 3.25, NaNO₂= 100, aerobiosis) (Tablas 11 y 12).

Tabla 15. Matriz de correlación para la fase de adaptación (λ) de *L. mesenteroides* en condiciones de aerobiosis

	<i>T</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl</i>	<i>NaNO₂</i>	λ
<i>T</i> (°C)	1				
<i>pH</i>	0	1			
<i>NaCl</i> (%)	0	0	1		
<i>NaNO₂</i> (ppm)	0	0	0	1	
λ (h)	-0.469**	-0.256	0.552**	0.242	1

** Correlación significativa en un nivel de 0.01

Tabla 16. Matriz de correlación para la fase de adaptación (λ) de *L. mesenteroides* en condiciones de anaerobiosis

	<i>T</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl</i>	<i>NaNO₂</i>	λ
<i>T</i> (°C)	1				
<i>pH</i>	0	1			
<i>NaCl</i> (%)	0	0	1		
<i>NaNO₂</i> (ppm)	0	0	0	1	
λ (h)	-0.567**	-0.307	0.587**	0.186	1

** Correlación significativa en un nivel de 0.01

El parámetro de crecimiento densidad máxima de población, y_{End} , tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, se observa que presenta una correlación significativa con la concentración de cloruro sódico y de nitritos ($p < 0.01$) y con el nivel de pH ($p < 0.05$), lo cual se muestra en las Tablas 17 y 18. Al igual que ocurría con la tasa máxima específica de crecimiento, cuando la temperatura y el pH aumentan se produce un incremento de y_{End} , mientras que al aumentar la concentración de NaCl y NaNO₂ en el medio de cultivo, este parámetro de crecimiento disminuye.

Para el parámetro cinético densidad máxima de población, el nivel más elevado correspondió al valor de absorbancia $y_{End} = 1.049$ DO ($T = 21^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$, $\text{NaCl} = 1.75$, $\text{NaNO}_2 = 50$, anaerobiosis) y el valor más bajo $y_{End} = 0.094$ DO ($T = 14^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6$, $\text{NaCl} = 4.75$, $\text{NaNO}_2 = 150$, anaerobiosis). (Tablas 11 y 12).

Tabla 17. Matriz de correlación para la densidad máxima de población (y_{End}) de *L. mesenteroides* en condiciones de aerobiosis

	<i>T</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl</i>	<i>NaNO₂</i>	<i>yEnd</i>
<i>T</i> (°C)	1				
<i>pH</i>	0	1			
<i>NaCl</i> (%)	0	0	1		
<i>NaNO₂</i> (ppm)	0	0	0	1	
<i>yEnd</i>	0.361	0.381*	-0.594**	-0.554**	1

** Correlación significativa en un nivel de 0.01

* Correlación significativa en un nivel de 0.05

Tabla 18. Matriz de correlación para la densidad máxima de población (y_{End}) de *L. mesenteroides* en condiciones de anaerobiosis

	<i>T</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl</i>	<i>NaNO₂</i>	<i>yEnd</i>
<i>T</i> (°C)	1				
<i>pH</i>	0	1			
<i>NaCl</i> (%)	0	0	1		
<i>NaNO₂</i> (ppm)	0	0	0	1	
<i>yEnd</i>	0.133	0.410*	-0.493**	-0.629**	1

** Correlación significativa en un nivel de 0.01

* Correlación significativa en un nivel de 0.05

A continuación se describen con mayor detalle el efecto de cada uno de los factores ambientales estudiados sobre los parámetros de crecimiento μ_{max} , λ , y_{End} .

5.2.2.1. Temperatura

Se observó que *L. mesenteroides* creció a todas las temperaturas de estudio, incluso a las más bajas cuando los niveles de sal y nitritos fueron elevados o el pH bajo (Tabla 11 y 12), coincidiendo con los resultados obtenidos en otros trabajos, donde este microorganismo creció a temperaturas comprendidas entre 2 y 12°C en un rango de pH de 5.5- 6.5 (Zhang y Holley, 1999; Anifantaki y col., 2002).

La temperatura fue el principal factor que influyó en el desarrollo y evolución de *L. mesenteroides*, de hecho, este factor fue el único que ejerció un efecto significativo ($p < 0.01$) sobre μ_{max} , tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Tabla 13 y 14). La temperatura también tuvo una influencia significativa ($p < 0.01$) sobre λ en los dos ambientes gaseosos, pero en este caso este parámetro también se vio influido por la concentración de NaCl.

5.2.2.2. pH

En nuestro trabajo, se observó crecimiento a todos los valores de pH tanto en aerobiosis como anaerobiosis (Tabla 11 y 12). En los rangos estudiados, el pH presentó una correlación significativa con *yEnd* en aerobiosis y anaerobiosis a un nivel de 0.05 ($p < 0.05$) (Tablas 17 y 18). Este efecto fue destacado en un trabajo realizado por Zhang y Holley (1999), en el cual se observaron diferencias significativas en los niveles microbianos alcanzados de *L. mesenteroides* y otras BAL (aisladas de productos cárnicos envasados al vacío), cuando fueron inoculadas en caldo MRS, en un rango de pH comprendido entre 5.5 y 6.5.

5.2.2.3. Cloruro sódico

La concentración salina añadida a los medios de cultivo en un porcentaje variable, entre 0.25- 6.25%, influyó significativamente sobre la fase de adaptación y sobre la densidad máxima de población ($p < 0.01$), tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Tablas 15 a 18), no siendo su efecto significativo en relación con la tasa máxima específica de crecimiento.

Se ha observado crecimiento de *L. mesenteroides* a todas las concentraciones estudiadas (Tabla 11 y 12), incluso a la máxima, 6.25%, de lo cual existen referencias en la literatura (Sneath y col., 1986, 1991). Además en nuestro estudio se ha observado como este microorganismo es capaz de crecer a elevados niveles de sal, en combinación con también elevadas concentraciones de nitrito sódico. En un estudio realizado por Korkeala y col. (1992), con BAL inoculadas en caldo MRS a distintas concentraciones de cloruro sódico, se observó que cuando los niveles de sal estaban comprendidos entre 1-2% se producía un estímulo del crecimiento de estos microorganismos, mientras que la inhibición se manifestaba a partir de una concentración $> 3\%$. Otros, como Zhang y Holley (1999) observaron inhibición del crecimiento de BAL inoculadas en caldo MRS a concentraciones de 2.5 a 5.5% de cloruro sódico. Las diferencias observadas entre estos trabajos y el nuestro pueden deberse a que, en aquellos, no se estudiaron las interacciones entre los factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos; además se emplearon distintas cepas de *L. mesenteroides* y en algunos casos, mezclas de diversas cepas de BAL alterantes.

5.2.2.4. Nitrito sódico

El efecto de este factor sólo fue significativo sobre la densidad máxima de población y_{End} en los dos ambientes gaseosos ($p < 0.01$) (Tablas 17 y 18), mientras que para el resto de los parámetros de crecimiento no hay una correlación significativa.

Los menores niveles de y_{End} fueron alcanzados en aquellas condiciones experimentales en las que se combinan altas concentraciones de nitritos y sal, mientras que los mayores niveles de y_{End} se observaron en aquellos casos en los que al medio de cultivo se añadieron pequeñas cantidades de nitrito sódico (Tabla 11 y 12).

Otras investigaciones han estudiado el efecto de la concentración de nitritos sobre ciertas BAL en caldo de cultivo. En uno de estos trabajos se observó que dicho conservante tuvo poco efecto sobre el crecimiento microbiano cuando se añadían niveles de 50 y 100 ppm, mientras que la inhibición sólo fue manifiesta a partir de 400 ppm (Korkeala y col., 1992). En relación a los niveles de crecimiento alcanzados (Log ufc/ ml), Zhang y Holley (1999) describieron que no había diferencias significativas entre los niveles microbianos alcanzados con 100, 150 y 200 ppm de nitritos. En ambos trabajos, existen diferencias con respecto a los resultados obtenidos en nuestro estudio, pudiéndose deber a que en aquellos, no se estudiaron las interacciones entre los factores de crecimiento de los microorganismos, y además, se emplearon distintas cepas de *L. mesenteroides* o mezclas de cepas de BAL alterantes.

5.2.2.5. Atmósfera gaseosa

En las condiciones experimentales llevadas a cabo se observó que existieron diferencias significativas para la tasa de crecimiento y la fase de adaptación de *L. mesenteroides* entre aerobiosis y anaerobiosis ($p < 0.05$), mientras que para la densidad máxima de población no se observaron diferencias. *L. mesenteroides* fue capaz de desarrollarse en una atmósfera privada de oxígeno debido a su carácter anaerobio facultativo, si bien, en general este microorganismo experimentó un crecimiento más favorable en aerobiosis, con tasas de crecimiento más elevadas y fases de adaptación más cortas (Tabla 11 y 12). Existen diversas referencias en la literatura que destacan este comportamiento de BAL en ambientes de aerobiosis y anaerobiosis. Tal es el caso de los estudios comparativos realizados en productos cárnicos envasados en aerobiosis, vacío o atmósferas modificadas, en los cuales se observa un menor crecimiento de BAL

en estos dos últimos ambientes gaseosos, así como un incremento de la vida media comercial (Pikul y col., 1997; Cegielska- Radziejewska y Pikul, 2000; 2001).

5.2.3. Modelos Secundarios

En función de la relación existente entre los factores ambientales (temperatura, pH, concentración de NaCl y nivel de NaNO₂) y los parámetros cinéticos estimados, se han elaborado los dos modelos predictivos que estiman la respuesta de crecimiento de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*: Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales Artificiales (RN).

En los modelos predictivos elaborados, la exactitud o precisión entre los valores estimados y los observados, la complejidad de la ecuación desarrollada a la hora de su aplicación y, por último, la inversión de tiempo y esfuerzo requeridos para elaborar el modelo.

5.2.3.1. Respuesta en Superficie

A partir de los valores de los parámetros λ , μ_{max} , y End obtenidos mediante la ecuación reparametrizada de Baranyi y Roberts (1994), se elaboraron los modelos secundarios de Respuesta en Superficie, realizándose distintas transformaciones matemáticas. Del total de las curvas, 210, se empleó el 75% de éstas para la elaboración del modelo y el 25% restante para la generalización o validación interna.

Se realizaron ecuaciones de 2º y 3º grado, rechazando finalmente esta última, ya que se ha comprobado que los modelos cúbicos no aumentan la bondad de ajuste y que su elaboración y utilización son más complicadas (Buchanan y col., 1993a; Baranyi y Roberts, 1995).

5.2.3.1.1. RS en aerobiosis

A partir de los valores de crecimiento de *L. mesenteroides* observados en medio de cultivo MRS, bajo distintas condiciones y en atmósfera aeróbica (Tabla 11) y tras realizar distintas transformaciones, se escogieron las siguientes ecuaciones, que presentaron menor error y mejor ajuste:

$$\ln \lambda_{aero} = -0.0756 \times T + 1.5394 \times \text{NaCl} + 0.0188 \times \text{NaNO}_2 + 0.0594 \times \text{pH}^2 - 0.2146 \times (\text{pH} \times \text{NaCl}) - 0.0028 \times (\text{pH} \times \text{NaNO}_2) + 0.0006 \times (\text{NaCl} \times \text{NaNO}_2)$$

$$R^2 = 0.859$$

$$\mu_{max\ aero} = -0.0666 \times T + 0.1929 \times \text{pH} - 0.0439 \times \text{NaCl} - 0.0006 \times \text{NaNO}_2 + 0.0026 \times T^2 - 0.0110 \times \text{pH}^2 + 0.0115 \times \text{NaCl}^2 + 0.0000022 \times \text{NaNO}_2^2 - 0.0079 \times (\text{pH} \times \text{NaCl})$$

$$R^2 = 0.942$$

$$y\ End_{aero} = 0.0484 \times T - 0.2353 \times \text{pH} - 0.7059 \times \text{NaCl} - 0.0054 \times \text{NaNO}_2 + 0.0216 \times \text{pH}^2 - 0.0232 \times \text{NaCl}^2 + 0.1024 \times (\text{pH} \times \text{NaCl})$$

$$R^2 = 0.935$$

A partir de estas ecuaciones se han obtenido los valores predictivos de cada parámetro para cada una de las condiciones experimentales del diseño, predicciones que son detalladas en la Tabla 19.

En la Tabla 20 se muestran diversos índices estadísticos que indican las desviaciones medias entre los valores observados y predictivos para cada uno de los modelos en aerobiosis. Como se puede observar, las ecuaciones polinómicas alcanzan un elevado valor del coeficiente de regresión múltiple (R^2) y un mínimo valor para el estadístico *RMSE*, lo que indica un elevado ajuste de los datos experimentales. Para ambos coeficientes, los mejores valores se han encontrado en el modelo de la tasa máxima de crecimiento, como se describió en otros estudios (Barco, 2001; Castillejo, 2002), siendo este parámetro el más modelado en la literatura científica, ya que μ_{max} no depende de la historia del inóculo como en el caso de λ .

También en la Tabla 20 se muestra que el Error Estándar de Predicción, *SEP*, presenta unos valores bajos, por debajo del 11% para todos los parámetros, corroborando la coincidencia entre los valores observados y predictivos.

Los índices sesgo (B_f) y exactitud (A_f) han sido calculados para determinar la bondad de ajuste de los modelos de RS elaborados. El valor perfecto de estos índices debería ser la unidad, $B_f = A_f = 1$. Sin embargo, esto es difícil de conseguir y se considera como aceptable que estos valores se incrementen en 0.10- 0.15 por cada variable incluida en el modelo (Ross y col., 2000a). Por tanto, en nuestro estudio, con cuatro variables (T, pH, nivel de sal y nitritos) deberíamos esperar índices con valores $B_f = A_f = 1.4- 1.6$. En la Tabla 20 observamos como estos índices se aproximan a la unidad, que supone la concordancia perfecta, indicándonos pues, que existe muy buen ajuste entre los valores experimentales y los valores predictivos obtenidos a partir de los modelos de RS desarrollados para los parámetros $Ln \lambda$, μ_{max} e y_{End} .

Para todos los parámetros, el índice B_f es muy próximo a 1, situándose ligeramente por encima para λ y μ_{max} . El hecho de que, para la tasa de crecimiento, el índice B_f sea superior a 1, es importante principalmente en el caso de los microorganismos patógenos, ya que nos puede ayudar a estimar con anticipación su posible crecimiento y establecer una predicción segura en el ámbito del riesgo alimentario. Para los microorganismos alterantes, un valor $B_f > 1$ para la tasa de crecimiento, nos indica una predicción adecuada en relación con la vida comercial, ya que se estimará con anticipación la alteración sensorial del producto, debido al desarrollo de este tipo de microorganismos. Sin embargo, no sería conveniente que esta estimación de vida comercial fuera mucho mayor que la observada, ya que en este caso se podrían producir pérdidas importantes para los productores al retirar del mercado productos aun aptos para el consumo.

Para obtener información acerca del promedio de la exactitud de las estimaciones se ha calculado el índice A_f , y podemos observar que en todos los casos los valores son próximos a la unidad, si bien, el modelo de RS es más preciso en la estimación de los parámetros μ_{max} e y_{End} que para $Ln \lambda$.

Tabla 19. Valores predictivos obtenidos mediante los modelos de Respuesta en Superficie para la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y densidad máxima de población (y_{End}) de *L. mesenteroides* en aerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	μ_{max} (h^{-1})	λ (h)	<i>yEnd</i> (DO)
10.5	6.5	3.25	100	0.150	11.478	0.359
14	6	1.75	50	0.190	5.329	0.633
14	6	1.75	150	0.174	7.229	0.369
14	6	4.75	50	0.140	12.411	0.306
14	6	4.75	150	0.124	20.157	0.178
14	7	1.75	50	0.226	6.888	0.792
14	7	1.75	150	0.210	7.063	0.462
14	7	4.75	50	0.152	8.427	0.521
14	7	4.75	150	0.136	10.344	0.303
17.5	5.5	3.25	100	0.159	8.810	0.353
17.5	7.5	3.25	100	0.207	5.884	0.751
17.5	6.5	3.25	0	0.232	5.240	0.864
17.5	6.5	3.25	200	0.200	8.726	0.294
17.5	6.5	3.25	100	0.194	6.762	0.504
17.5	6.5	6.25	100	0.236	12.488	0.230
17.5	6.5	0.25	100	0.359	3.661	0.725
21	6	1.75	50	0.360	3.139	0.888
21	6	1.75	150	0.344	4.259	0.517
21	6	4.75	50	0.311	7.311	0.429
21	6	4.75	150	0.295	11.874	0.250
21	7	1.75	50	0.396	4.058	1.112
21	7	1.75	150	0.380	4.160	0.648
21	7	4.75	50	0.323	4.964	0.731
21	7	4.75	150	0.307	6.093	0.426
24.5	6.5	3.25	100	0.492	3.983	0.707

DO: unidades de densidad óptica

Tabla 20. Errores de estimación de los parámetros de crecimiento de *L. mesenteroides* para los modelos de Respuesta en Superficie en aerobiosis.

	R^2	RMSE	SEP modelo	B_f	A_f	N
$Ln \lambda (h^{-1})$	0.859	0.169	8.89	1.03	1.14	7
$\mu_{max} (h)$	0.942	0.022	9.54	1.01	1.08	9
$yEnd (DO)$	0.935	0.054	10.27	1.00	1.09	7

R^2 : coeficiente de regresión múltiple

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP modelo: % Error estándar de predicción del modelo

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

N: número de coeficientes (complejidad del modelo)

DO: unidades de densidad óptica

A la hora de elegir el modelo que mejor estima la respuesta de crecimiento de un microorganismo, es importante la capacidad de generalización que posea dicho modelo. Por ello, se realizó la validación interna de los modelos matemáticos elaborados, utilizando el 25% del total de los datos, es decir, las réplicas de los valores observados para λ , μ_{max} e $yEnd$ en las mismas condiciones experimentales que las empleadas para elaborar los modelos. Los valores obtenidos en la validación interna para los índices SEP, B_f y A_f para los tres parámetros cinéticos fueron muy similares a los resultantes con los datos del modelo. El error SEP mostró valores reducidos, siendo 8.28% para λ , 9.95% para μ_{max} y 10.59 % para $yEnd$ en aerobiosis. Los índices B_f fueron en todos los casos próximos a la unidad, con valores de 1.01, 1.01 y 0.98 para λ , μ_{max} e $yEnd$ respectivamente, lo cual indica un elevado ajuste entre las observaciones y las estimaciones. Resultados muy parecidos se observaron para el factor A_f , variando entre 1.09 y 1.14.

5.2.3.1.2. RS en anaerobiosis

A partir de los parámetros de crecimiento de *L. mesenteroides* observados, bajo distintas condiciones y en atmósfera anaeróbica (Tabla 12) y tras realizar distintas transformaciones, se escogieron las siguientes ecuaciones, que presentaron menor error y mejor ajuste:

$$\begin{aligned} \ln \lambda_{anaero} = & 8.6726 - 2.4963 \times \text{pH} + 1.1063 \times \text{NaCl} + 0.0177 \times \text{NaNO}_2 + 0.0031 \times T^2 \\ & + 0.2659 \times \text{pH}^2 + 0.0115 \times \text{NaCl}^2 - 0.0310 \times (T \times \text{pH}) - 0.1479 \times (\text{pH} \times \text{NaCl}) - \\ & 0.0024 \times (\text{pH} \times \text{NaNO}_2) \end{aligned}$$

$$R^2 = 0.940$$

$$\begin{aligned} \mu_{max \text{ anaero}} = & -0.0518 \times T + 0.1780 \times \text{pH} - 0.0922 \times \text{NaCl} - 0.0006 \times \text{NaNO}_2 + 0.0021 \times T^2 \\ & - 0.0121 \times \text{pH}^2 + 0.0111 \times \text{NaCl}^2 + 0.0000021 \times \text{NaNO}_2 \end{aligned}$$

$$R^2 = 0.936$$

$$\begin{aligned} y \text{ End}_{anaero} = & 0.3045 \times T - 0.4573 \times \text{pH} - 1.0349 \times \text{NaCl} - 0.0250 \times \text{NaNO}_2 - 0.0080 \times T^2 \\ & - 0.0502 \times \text{NaCl}^2 - 0.000029 \times \text{NaNO}_2^2 + 0.1867 \times (\text{pH} \times \text{NaCl}) + 0.0038 \times (\text{pH} \times \text{NaNO}_2) - \\ & 0.0006 \times (\text{NaCl} \times \text{NaNO}_2) \end{aligned}$$

$$R^2 = 0.902$$

A partir de estas ecuaciones se han estimado los valores predictivos de cada parámetro cinético para las condiciones experimentales del diseño en anaerobiosis (Tabla 21).

En la Tabla 22 se muestran los índices estadísticos que indican el nivel de ajuste de los modelos de RS elaborados. El coeficiente de regresión múltiple (R^2) para las ecuaciones polinómicas alcanza un valor elevado, mientras que el estadístico *RMSE* presenta un valor reducido, principalmente para la tasa máxima de crecimiento, coincidiendo con otros estudios realizados para diversos microorganismos (Barco, 2001; Castillejo, 2002). También podemos observar en esta Tabla unos valores reducidos del Error Estándar de Predicción, *SEP*, del orden del 6% para $\ln \lambda$, 10% para μ_{max} y del 16% para $y \text{ End}$, mostrándose por tanto un elevado ajuste entre los valores observados y predictivos.

Tabla 21. Valores predictivos obtenidos mediante los modelos de Respuesta en Superficie para la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y densidad máxima de población (y_{End}) de *L. mesenteroides* en anaerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	μ_{max} (h ⁻¹)	λ (h)	<i>yEnd</i> (DO)
10.5	6.5	3.25	100	0.112	15.022	0.326
14	6	1.75	50	0.167	6.386	0.750
14	6	1.75	150	0.149	8.883	0.303
14	6	4.75	50	0.107	15.410	0.332
14	6	4.75	150	0.089	21.435	0.112
14	7	1.75	50	0.187	7.401	0.795
14	7	1.75	150	0.169	8.098	0.471
14	7	4.75	50	0.127	11.461	0.618
14	7	4.75	150	0.109	12.540	0.305
17.5	5.5	3.25	100	0.128	11.885	0.337
17.5	7.5	3.25	100	0.170	6.487	0.972
17.5	6.5	3.25	0	0.200	5.455	0.958
17.5	6.5	3.25	200	0.164	8.303	0.191
17.5	6.5	3.25	100	0.161	6.730	0.572
17.5	6.5	6.25	100	0.201	14.429	0.195
17.5	6.5	0.25	100	0.321	3.861	0.679
21	6	1.75	50	0.319	3.712	0.890
21	6	1.75	150	0.301	5.163	0.360
21	6	4.75	50	0.258	8.958	0.395
21	6	4.75	150	0.240	12.460	0.133
21	7	1.75	50	0.339	3.463	0.994
21	7	1.75	150	0.321	3.789	0.559
21	7	4.75	50	0.279	5.362	0.733
21	7	4.75	150	0.261	5.867	0.362
24.5	6.5	3.25	100	0.416	4.086	0.459

DO: unidades de densidad óptica

Tabla 22. Errores de estimación de los parámetros de crecimiento de *L. mesenteroides* para los modelos de Respuesta en Superficie en anaerobiosis.

	R^2	RMSE	SEP modelo	B_f	A_f	N
$\ln \lambda$ (h^{-1})	0.940	0.120	6.02	1.02	1.10	10
μ_{max} (h)	0.936	0.022	10.48	1.00	1.09	8
$yEnd$ (DO)	0.902	0.087	16.35	0.98	1.14	10

R^2 : coeficiente de regresión múltiple

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP modelo: % Error estándar de predicción del modelo

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

N : número de coeficientes (complejidad del modelo)

DO: unidades de densidad óptica

Los índices sesgo (B_f) y exactitud (A_f) han sido calculados (Tabla 22) y nos indican, por su proximidad a la unidad, que existe muy buen ajuste entre los datos calculados a partir de los modelos de RS y los datos experimentales. Ambos índices presentan valores superiores a 1 para todos los parámetros cinéticos estudiados, excepto el B_f de $yEnd$, que es ligeramente inferior a la unidad.

Al igual que se hizo con los modelos de RS en aerobiosis desarrollados, se realizó la validación interna o generalización, utilizando el 25% del total de los datos, es decir, las réplicas de los valores observados para λ , μ_{max} e $yEnd$ en las mismas condiciones experimentales que las empleadas para elaborar los modelos. Los valores obtenidos para los índices SEP, B_f y A_f para los tres parámetros cinéticos fueron muy similares a los resultantes con los datos del modelo. Los valores del error SEP fueron reducidos, siendo 6.58% para λ , 9.91% para μ_{max} y 16.31% para $yEnd$. Los índices B_f fueron muy próximos a 1, con valores de 1.01, 1.01 y 0.94 para λ , μ_{max} e $yEnd$ respectivamente, indicando un adecuado ajuste entre las observaciones y las estimaciones. Resultados similares se observaron para el factor A_f , variando entre 1.09 y 1.13.

5.2.3.2. Redes Neuronales Artificiales

A partir de los valores de los parámetros $\ln \lambda$, μ_{max} , $yEnd$ obtenidos mediante la ecuación reparametrizada de Baranyi y Roberts (1994), se han elaborado los modelos de RN. Al igual que en los modelos de RS, del total de las curvas, 210, se empleó el 75%

de éstas para la fase de entrenamiento de la red y el 25% restante para la fase de generalización.

Para seleccionar la estructura inicial de la red y el número de neuronas en la capa intermedia (oculta), se ha empleado una regla de tanteo (ensayo/ error). Como resultado, la estructura de la red neuronal inicial elegida, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, ha sido del tipo 4:4:1. Ésta supone una red formada por una capa de entrada con cuatro nodos (T, pH, concentración de NaCl y de NaNO₂), una capa intermedia con otros cuatro nodos y una capa de salida con un nodo, que es el parámetro de crecimiento a predecir. También se ha elaborado un modelo asociado o conjunto, es decir, un modelo que estima simultáneamente los tres parámetros cinéticos, siendo en este caso la estructura 4:4:3, en la que hay tres nodos en la capa de salida, uno por cada parámetro. Este tipo de modelo asociado se desarrolló exclusivamente con RN, ya que no es posible realizarlo con los modelos de RS.

Tras realizar 10 ejecuciones, con un coste medio computacional de 8 min/ejecución (siendo un inconveniente de estos modelos frente a otros, como los modelos de RS) se ha escogido como estructura final de la red aquella que presentó un menor error estándar de predicción (*SEP*), un menor número de conexiones y una buena capacidad de generalización o validación interna.

5.2.3.2.1. RN en aerobiosis

Los modelos de Redes Neuronales Artificiales (RN) en atmósfera aeróbica para la fase de adaptación, tasa máxima específica de crecimiento, densidad máxima de población, así como el modelo conjunto para los tres parámetros, quedan representadas en las Figuras 15, 16, 17 y 18 respectivamente. En la primera de las figuras se presentan todas las conexiones posibles, podadas o no, mientras que las siguientes aparecen simplificadas.

A partir de los modelos elaborados, tanto individuales como asociados, se han calculado los valores predictivos de cada parámetro cinético para las condiciones experimentales del diseño en aerobiosis (Tablas 23 y 24).

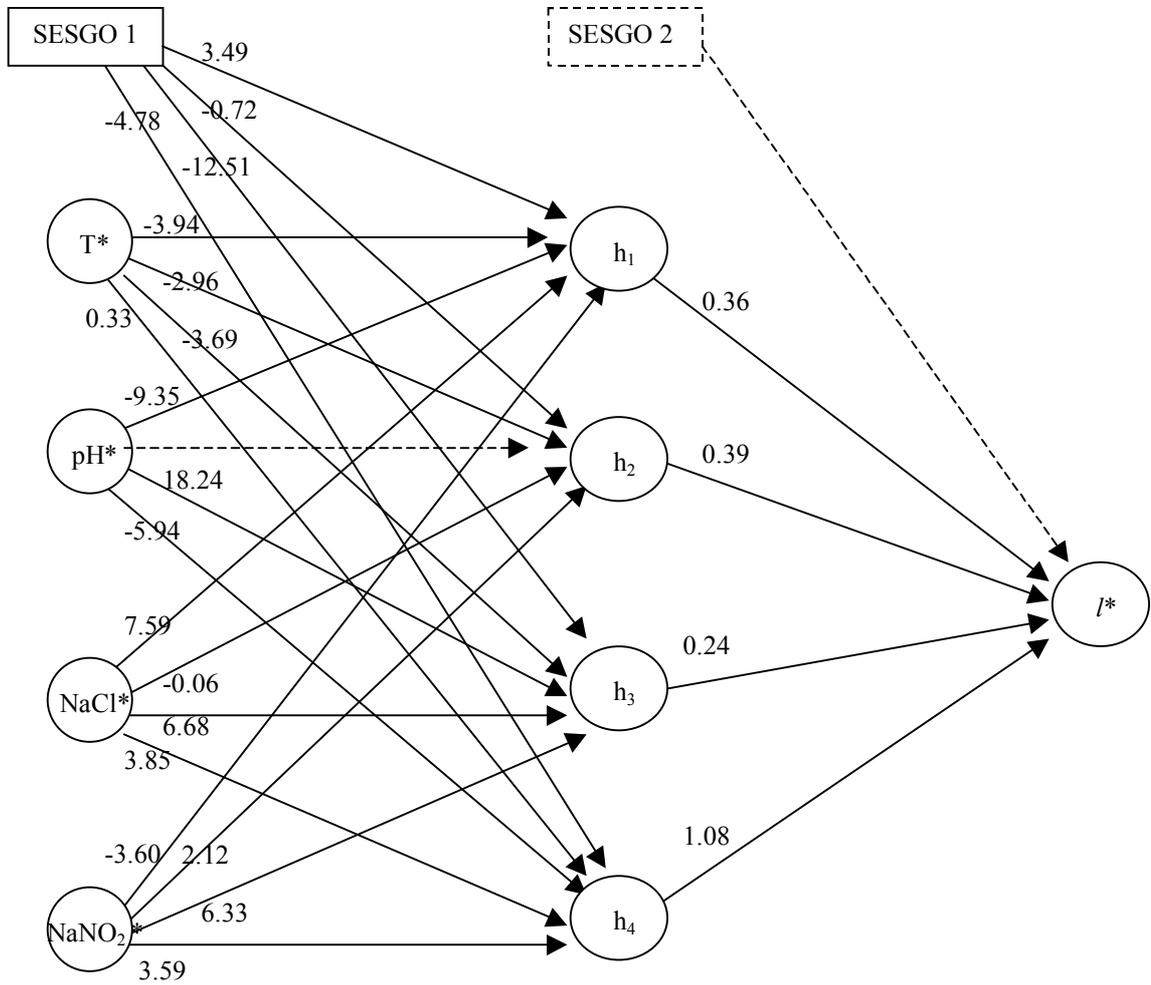


Figura 15. Representación de la red neuronal descrita para la fase de adaptación (l^*) en aerobiosis (líneas discontinuas: conexiones podadas).

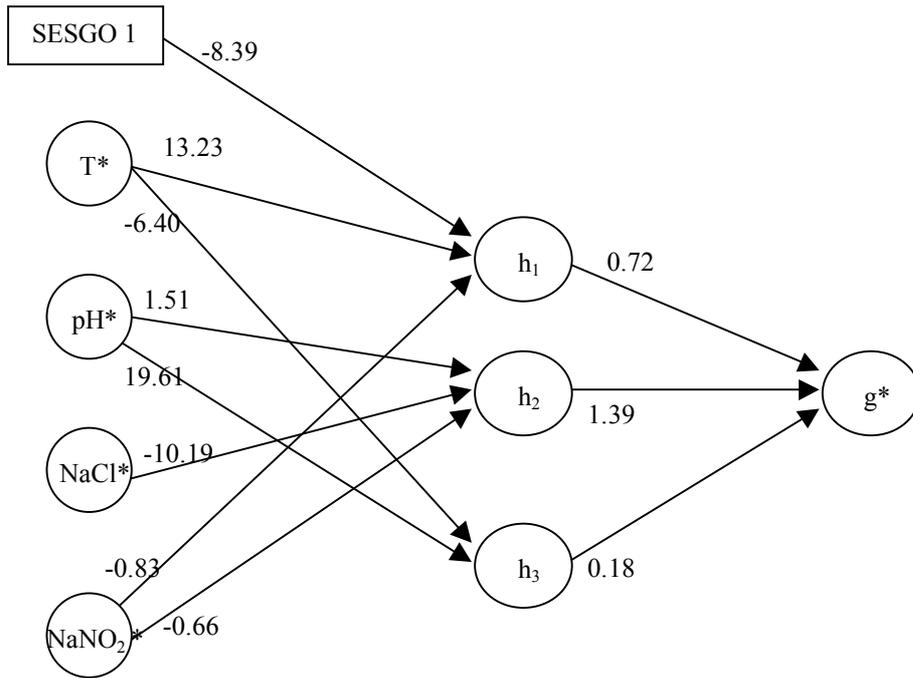


Figura 16. Representación de la red neuronal descrita para la tasa máxima específica de crecimiento (g^*) en aerobiosis.

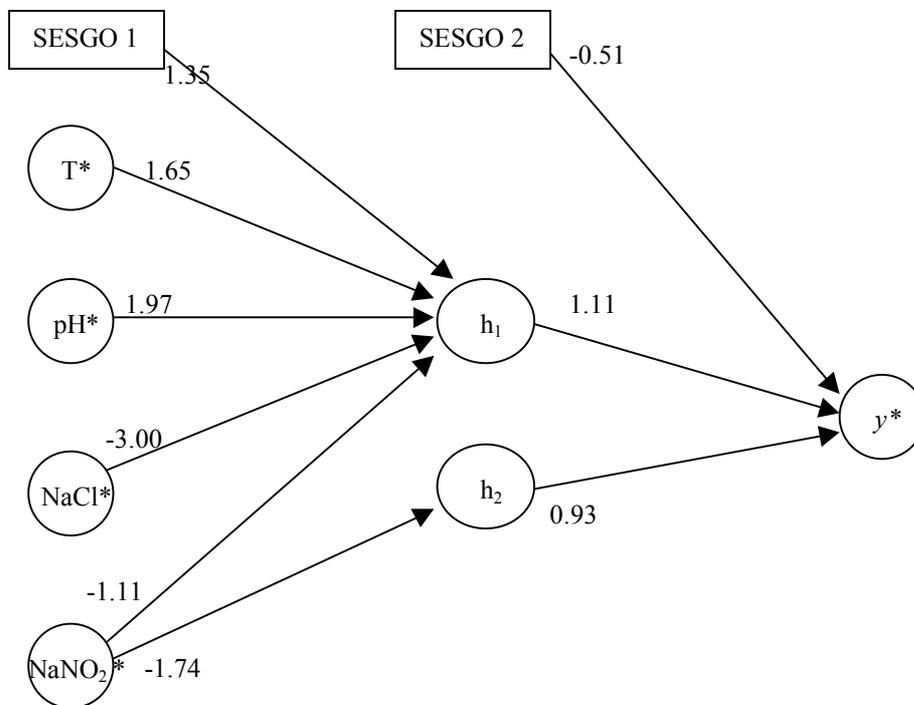


Figura 17. Representación de la red neuronal descrita para la densidad máxima de población (y^*) en aerobiosis.

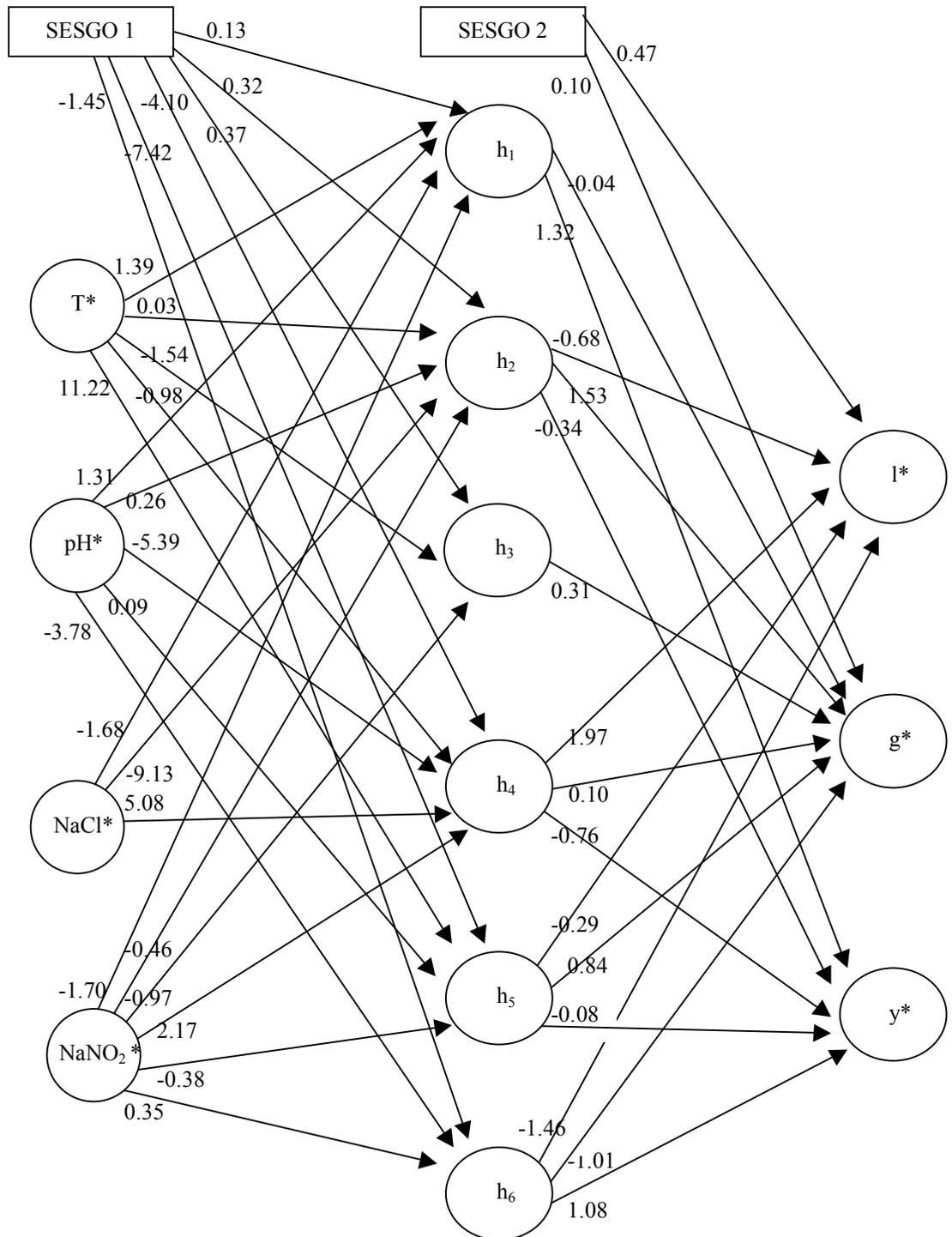


Figura 18. Representación de la red neuronal descrita para el modelo asociado: fase de adaptación (l^*), tasa máxima específica de crecimiento (g^*) y densidad máxima de población (y^*) en aerobiosis.

Tabla 23. Valores predictivos obtenidos mediante los modelos individuales de Redes Neuronales Artificiales para la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y densidad máxima de población (y_{End}) de *L. mesenteroides* en aerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	μ_{max} (h^{-1})	λ (h)	<i>yEnd</i> (DO)
10.5	6.5	3.25	100	0.147	12.705	0.345
14	6	1.75	50	0.175	5.950	0.626
14	6	1.75	150	0.167	6.320	0.359
14	6	4.75	50	0.143	9.736	0.307
14	6	4.75	150	0.143	22.801	0.167
14	7	1.75	50	0.200	5.801	0.840
14	7	1.75	150	0.188	7.070	0.526
14	7	4.75	50	0.145	9.119	0.505
14	7	4.75	150	0.144	8.712	0.279
17.5	5.5	3.25	100	0.117	10.374	0.318
17.5	7.5	3.25	100	0.180	5.567	0.687
17.5	6.5	3.25	0	0.187	5.168	0.875
17.5	6.5	3.25	200	0.167	8.219	0.300
17.5	6.5	3.25	100	0.176	6.254	0.503
17.5	6.5	6.25	100	0.171	14.531	0.242
17.5	6.5	0.25	100	0.370	3.447	0.765
21	6	1.75	50	0.348	3.513	0.809
21	6	1.75	150	0.318	3.619	0.500
21	6	4.75	50	0.317	6.953	0.468
21	6	4.75	150	0.294	10.855	0.257
21	7	1.75	50	0.387	4.380	0.970
21	7	1.75	150	0.352	5.380	0.644
21	7	4.75	50	0.332	5.646	0.698
21	7	4.75	150	0.309	5.868	0.412
24.5	6.5	3.25	100	0.424	3.697	0.660

DO: unidades de densidad óptica

Tabla 24. Valores predictivos obtenidos mediante el modelo asociado de Redes Neuronales Artificiales para la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y densidad máxima de población (y_{End}) de *L. mesenteroides* en aerobiosis.

T (°C)	pH	NaCl (%)	NaNO ₂ (ppm)	μ_{max} (h ⁻¹)	λ (h)	y_{End} (DO)
10.5	6.5	3.25	100	0.152	7.930	0.336
14	6	1.75	50	0.175	5.634	0.604
14	6	1.75	150	0.155	6.378	0.358
14	6	4.75	50	0.136	11.836	0.312
14	6	4.75	150	0.127	23.224	0.166
14	7	1.75	50	0.201	6.313	0.801
14	7	1.75	150	0.183	6.521	0.477
14	7	4.75	50	0.153	7.931	0.493
14	7	4.75	150	0.143	8.922	0.290
17.5	5.5	3.25	100	0.130	9.664	0.352
17.5	7.5	3.25	100	0.185	6.822	0.732
17.5	6.5	3.25	0	0.190	6.352	0.866
17.5	6.5	3.25	200	0.159	8.000	0.297
17.5	6.5	3.25	100	0.173	6.822	0.506
17.5	6.5	6.25	100	0.173	14.115	0.243
17.5	6.5	0.25	100	0.369	3.468	0.683
21	6	1.75	50	0.349	3.552	0.844
21	6	1.75	150	0.319	3.953	0.502
21	6	4.75	50	0.308	6.273	0.456
21	6	4.75	150	0.289	10.800	0.235
21	7	1.75	50	0.379	4.076	1.054
21	7	1.75	150	0.351	4.299	0.667
21	7	4.75	50	0.330	4.996	0.690
21	7	4.75	150	0.311	5.548	0.399
24.5	6.5	3.25	100	0.429	3.598	0.681

DO: unidades de densidad óptica

En la Tabla 25 se muestra la estructura de la arquitectura final de las redes para cada parámetro. También en dicha tabla se pueden observar los errores de estimación que indican el ajuste de los modelos de RN, como son el *SEP*, *RMSE*, B_f y A_f , así como el número de conexiones existentes en cada red como indicativo de la complejidad del modelo. En la Tabla 26 aparecen los mismos índices pero referidos al modelo asociado o conjunto de RN para los tres parámetros.

Tabla 25. Errores de estimación de los parámetros de crecimiento de *L. mesenteroides* para los modelos individuales de Redes Neuronales de en aerobiosis.

	<i>Arquitectura Red</i>	<i>RMSE</i>	<i>SEP modelo</i>	B_f	A_f	<i>N</i>
$\ln \lambda (h^{-1})$	4:4:1	0.115	6.05	1.01	1.10	23
$\mu_{max} (h)$	4:3:1	0.006	2.82	1.00	1.02	11
<i>y End (DO)</i>	4:2:1	0.053	10.00	0.99	1.10	9

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP modelo: % Error estándar de predicción del modelo

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

N: número de coeficientes (complejidad del modelo)

DO: unidades de densidad óptica

Podemos observar en la Tabla 25 que el estadístico *RMSE* es reducido para los modelos individuales de los tres parámetros cinéticos, principalmente para la tasa máxima de crecimiento. Además, se muestra que *SEP*, presenta unos valores bajos, alrededor del 10% para la densidad máxima de población, 6% para la fase de adaptación, e inferior al 3% para la tasa máxima de crecimiento. Ambos índices matemáticos, *RMSE* y *SEP*, indican por tanto, un elevado ajuste entre los valores experimentales y predictivos, siendo el modelo más ajustado el de la tasa máxima de crecimiento, hecho reseñado en otros estudios (Barco, 2001).

Los índices B_f y A_f han sido calculados para cada uno de los parámetros cinéticos (Tabla 25) y comprobamos cómo todos ellos se aproximan a la unidad, siendo indicio de buen ajuste entre los valores observados y predictivos. Para todos los parámetros cinéticos, el índice sesgo, B_f , es prácticamente 1, siendo exacto para la tasa máxima de crecimiento. El índice A_f , con el que obtenemos información sobre el promedio de la exactitud de las estimaciones, muestra valores ligeramente superiores a la unidad, si bien, el modelo individual de RN para μ_{max} es el más preciso.

Tabla 26. Errores de estimación de los parámetros de crecimiento de *L. mesenteroides* para el modelo asociado de Redes Neuronales en aerobiosis.

<i>Arquitectura Red</i>		<i>RMSE</i>	<i>SEP modelo</i>	<i>B_f</i>	<i>A_f</i>	<i>N</i>
4:6:3	<i>Ln λ (h⁻¹)</i>	0.163	8.60	1.01	1.13	42
	<i>μ_{max} (h)</i>	0.008	3.65	1.00	1.03	
	<i>y End (DO)</i>	0.050	9.50	0.99	1.09	

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP modelo: % Error estándar de predicción del modelo

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

N: número de coeficientes (complejidad del modelo)

DO: unidades de densidad óptica

Para el modelo asociado de Redes Neuronales, que predice los parámetros de crecimiento de *L. mesenteroides* en aerobiosis, también se han calculado los errores de estimación. Como se observa en la Tabla 26, para los tres parámetros cinéticos, existe un buen ajuste entre los valores experimentales y predictivos, ya que los valores de los índices matemáticos *RMSE* y *SEP* son muy reducidos, al igual que ocurría en los modelos individuales de Redes Neuronales. Principalmente destacan los mínimos errores de estimación de la tasa máxima de crecimiento, con unos valores de *RMSE*= 0.008 y *SEP*= 3.65%.

El adecuado ajuste entre los datos experimentales y los valores estimados también es constatado por el *B_f* y *A_f* (Tabla 26) ya que para los tres parámetros, *μ_{max}*, *λ* e *yEnd*, los índices presentan un valor muy próximo o igual a 1, siendo las estimaciones más exactas las correspondientes a la tasa máxima de crecimiento (*B_f*= 1.00 y *A_f*= 1.03).

Al igual que se hizo con los modelos de RS, se realizó la validación interna o generalización, utilizando el 25% del total de los datos, es decir, las réplicas de los valores observados para *λ*, *μ_{max}* e *yEnd* en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para elaborar los modelos. Los valores obtenidos en la validación interna para los índices *SEP*, *B_f* y *A_f* en aerobiosis para los tres parámetros cinéticos fueron muy similares a los resultantes con los datos del modelo, tanto para los modelos individuales como para el conjunto. Los valores del error *SEP* fueron reducidos, siendo *λ*= 5.41%, *μ_{max}*= 2.83% y *yEnd*= 9.88 % para los modelos de RN individual y *λ*= 8.19%, *μ_{max}*=

3.91% y $y_{End}= 10.08\%$ para el modelo de RN asociado o conjunto. Los índices sesgo fueron próximos o iguales a 1, con valores $B_f \approx 0.99, 1.00$ y 0.96 para λ, μ_{max} e y_{End} , indicando un adecuado ajuste entre las observaciones y las estimaciones. Resultados similares se observaron para el factor A_f , variando entre 1.02 y 1.11.

Se realizó un completo análisis estadístico para establecer cual de los modelos de RN en aerobiosis, individual o conjunto, fue más adecuado para su aplicación.

Para los tres parámetros cinéticos, se observó que la suma del número de conexiones de los modelos individuales, 16.2 (para λ), 12.6 (para μ_{max}) y 15.2 (para y_{End}), es decir, 44.0, fue superior al número de conexiones del conjunto, 39.2.

Para el parámetro cinético **fase de adaptación**, sin embargo, siendo $\alpha= 0.05$, la media del SEP de generalización del modelo individual fue menor aunque no significativamente (7.10 frente a 7.23).

Para la **tasa máxima de crecimiento**, la media del SEP de generalización del modelo individual (3.18 frente a 4.82) fue en este caso significativamente inferior al modelo conjunto y las desviaciones típicas fueron más pequeñas (2.79×10^{-3} frente a 9.31×10^{-3}) aunque no significativamente.

Por último, la **densidad máxima de población**, el modelo individual presentó una media del SEP de generalización menor al modelo conjunto (14.77 frente a 15.47), aunque no significativamente, siendo además las desviaciones típicas inferiores aunque tampoco significativamente (4.06×10^{-3} frente a 7.34×10^{-3}).

Por todo lo expuesto anteriormente, únicamente para la tasa máxima de crecimiento se observó claramente que el modelo más adecuado fue el modelo individual, mientras que para la fase de adaptación y la densidad máxima de población, no se observó un claro criterio de elección, por lo que, tanto el modelo individual como el conjunto fueron adecuados para describir dichos parámetros cinéticos.

5.2.3.2.2. RN en anaerobiosis

Los modelos de Redes Neuronales Artificiales (RN) en anaerobiosis se muestran en las Figuras 19, 20, 21 y 22 respectivamente para la fase de adaptación, tasa máxima específica de crecimiento, densidad máxima de población y modelo asociado o conjunto.

A partir de los modelos elaborados, individuales y asociados, se han calculado los valores predictivos de cada parámetro cinético para las condiciones experimentales del diseño en anaerobiosis y aparecen en las Tablas 27 y 28.

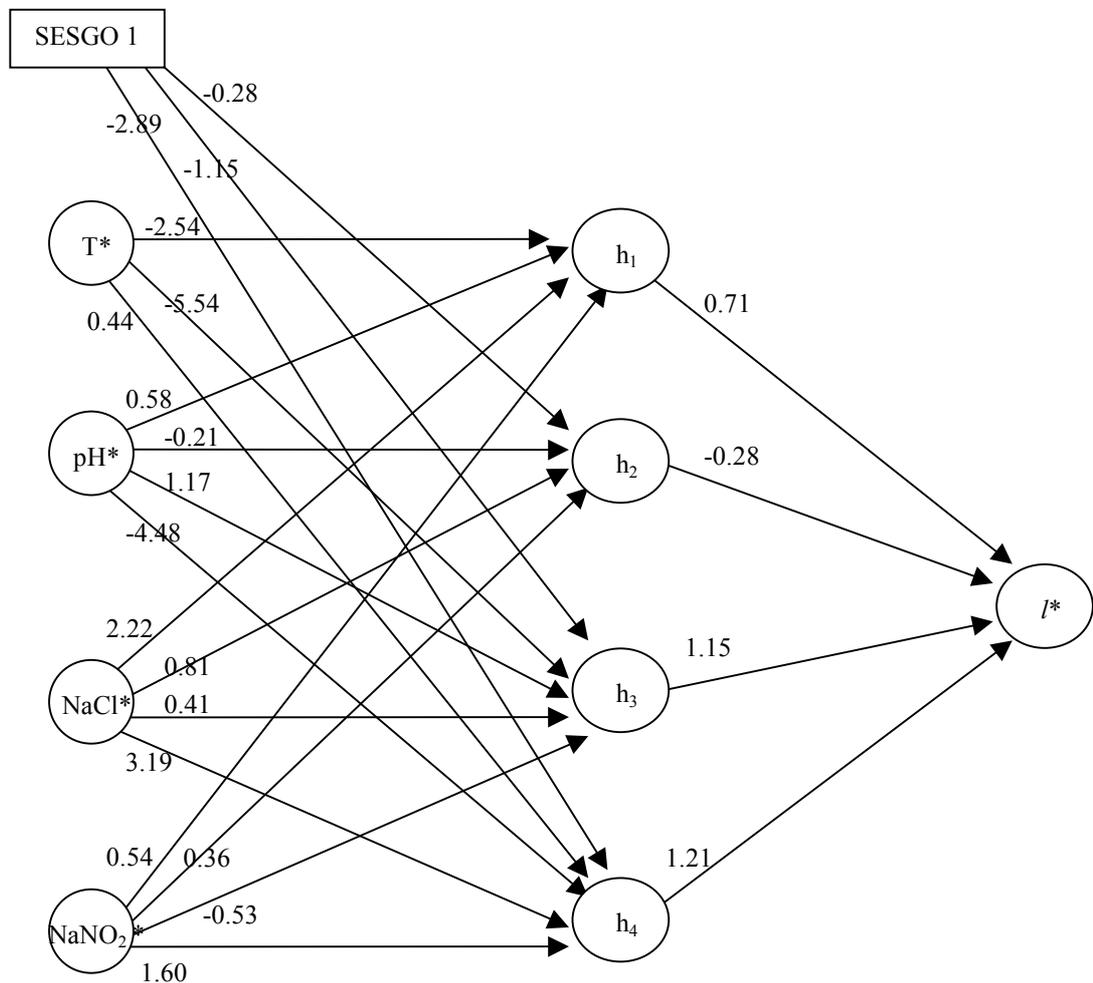


Figura 19. Representación de la red neuronal descrita para la fase de adaptación (l^*) en anaerobiosis.

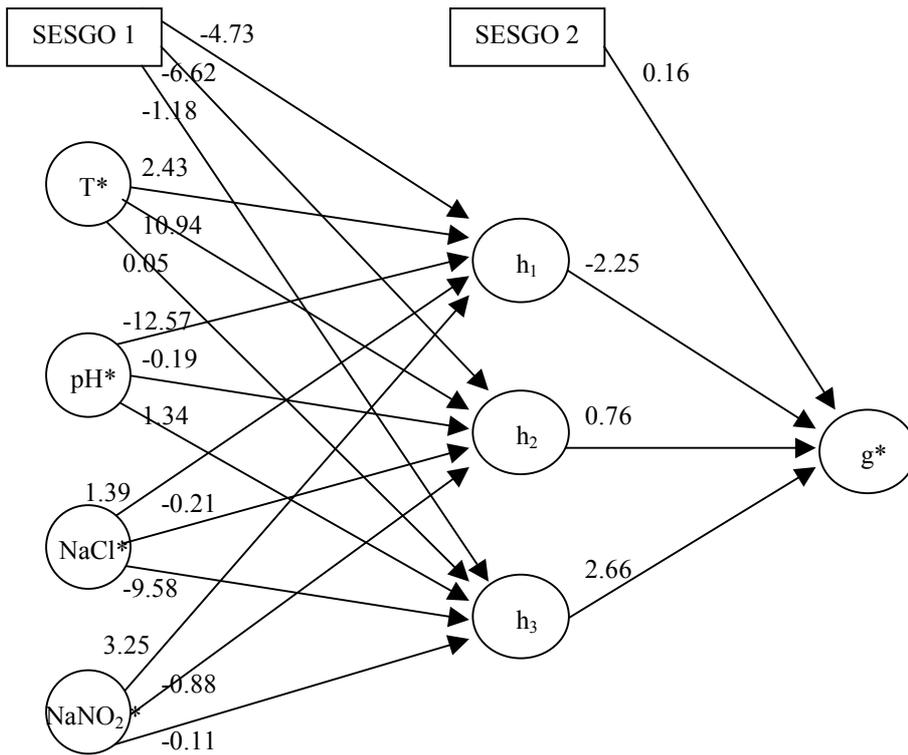


Figura 20. Representación de la red neuronal descrita para la tasa máxima específica de crecimiento (g^*) en anaerobiosis

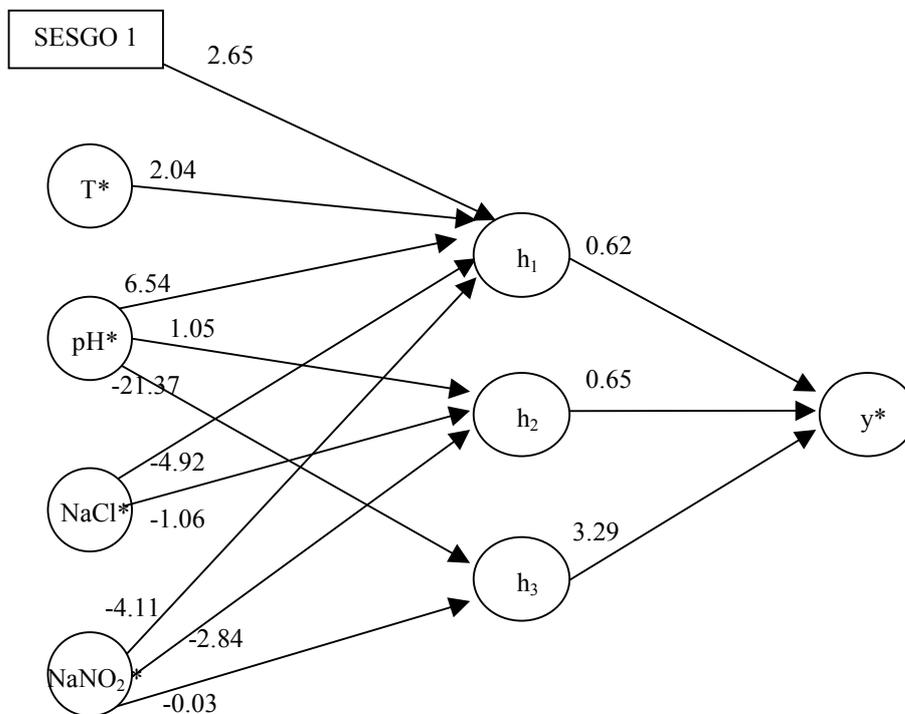


Figura 21. Representación de la red neuronal descrita para la densidad máxima de población (y^*) en anaerobiosis.

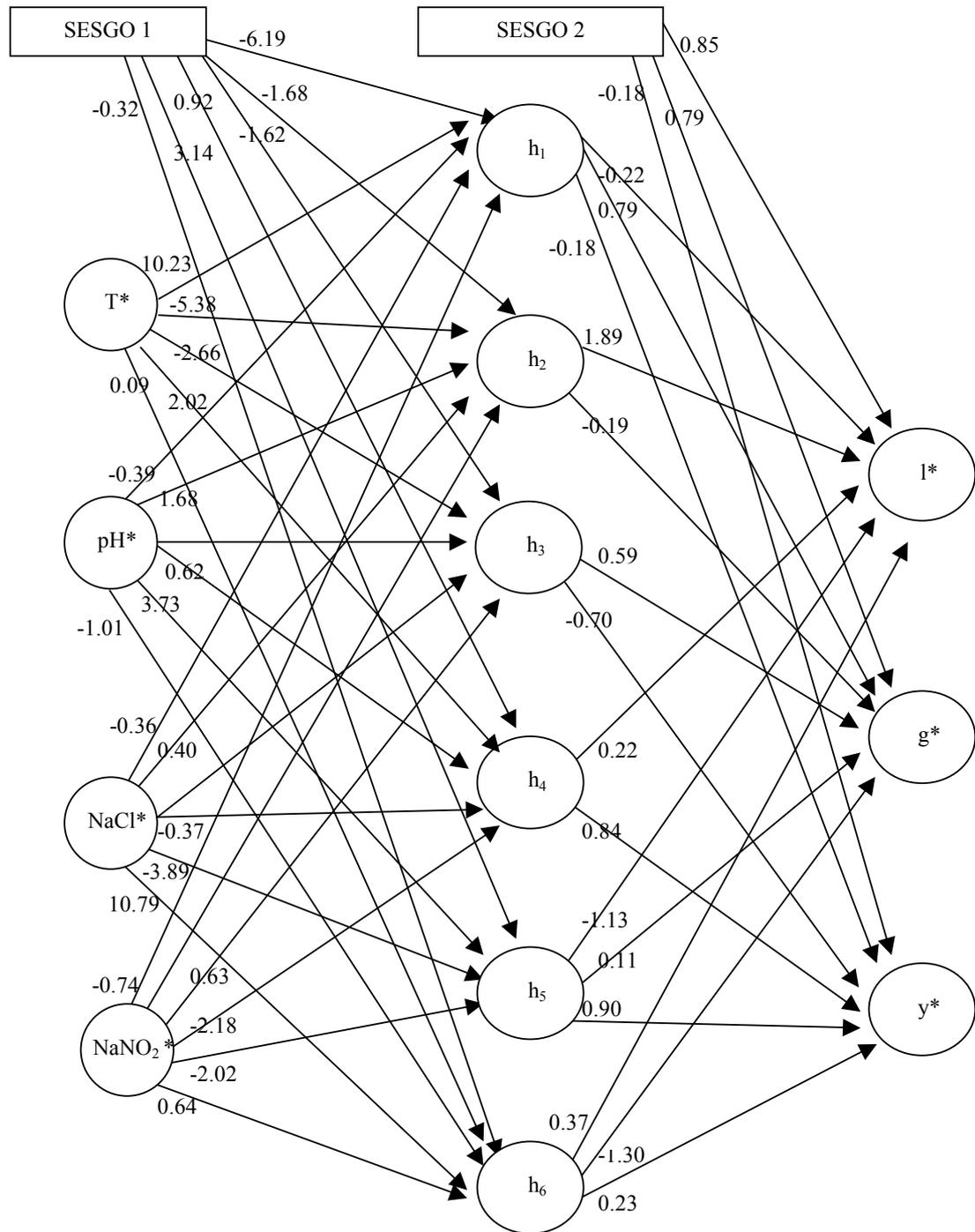


Figura 22. Representación de la red neuronal descrita para el modelo asociado: fase de adaptación (l^*), tasa máxima específica de crecimiento (g^*) y densidad máxima de población (y^*) en anaerobiosis.

Tabla 27. Valores predictivos obtenidos mediante los modelos individuales de Redes Neuronales Artificiales para la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y densidad máxima de población (y_{End}) de *L. mesenteroides* en anaerobiosis.

T (°C)	pH	NaCl (%)	NaNO ₂ (ppm)	μ_{max} (h ⁻¹)	λ (h)	y_{End} (DO)
10.5	6.5	3.25	100	0.129	16.266	0.414
14	6	1.75	50	0.155	6.730	0.668
14	6	1.75	150	0.148	8.049	0.265
14	6	4.75	50	0.128	13.970	0.284
14	6	4.75	150	0.119	20.034	0.086
14	7	1.75	50	0.174	7.313	0.959
14	7	1.75	150	0.170	7.568	0.537
14	7	4.75	50	0.130	10.978	0.706
14	7	4.75	150	0.128	11.690	0.337
17.5	5.5	3.25	100	0.101	11.388	0.534
17.5	7.5	3.25	100	0.173	6.260	0.711
17.5	6.5	3.25	0	0.187	5.447	1.018
17.5	6.5	3.25	200	0.158	7.849	0.221
17.5	6.5	3.25	100	0.171	6.309	0.503
17.5	6.5	6.25	100	0.163	13.200	0.218
17.5	6.5	0.25	100	0.364	3.797	0.704
21	6	1.75	50	0.346	3.641	0.732
21	6	1.75	150	0.309	4.584	0.363
21	6	4.75	50	0.311	7.974	0.411
21	6	4.75	150	0.267	12.653	0.129
21	7	1.75	50	0.363	3.446	0.966
21	7	1.75	150	0.335	3.788	0.557
21	7	4.75	50	0.313	5.376	0.743
21	7	4.75	150	0.287	6.379	0.415
24.5	6.5	3.25	100	0.410	3.819	0.555

DO: unidades de densidad óptica

Tabla 28. Valores predictivos obtenidos mediante el modelo asociado de Redes Neuronales Artificiales para la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}), fase de adaptación (λ) y densidad máxima de población (y_{End}) de *L. mesenteroides* en anaerobiosis.

T (°C)	pH	NaCl (%)	NaNO ₂ (ppm)	μ_{max} (h ⁻¹)	λ (h)	y_{End} (DO)
10.5	6.5	3.25	100	0.117	16.783	0.352
14	6	1.75	50	0.159	6.955	0.695
14	6	1.75	150	0.148	7.920	0.287
14	6	4.75	50	0.124	13.842	0.323
14	6	4.75	150	0.114	21.134	0.092
14	7	1.75	50	0.175	7.668	0.903
14	7	1.75	150	0.163	7.419	0.480
14	7	4.75	50	0.128	10.696	0.723
14	7	4.75	150	0.123	12.142	0.300
17.5	5.5	3.25	100	0.091	12.148	0.499
17.5	7.5	3.25	100	0.173	6.147	0.879
17.5	6.5	3.25	0	0.191	5.864	1.033
17.5	6.5	3.25	200	0.159	8.241	0.218
17.5	6.5	3.25	100	0.175	6.591	0.569
17.5	6.5	6.25	100	0.154	14.653	0.220
17.5	6.5	0.25	100	0.363	3.614	0.617
21	6	1.75	50	0.343	4.063	0.779
21	6	1.75	150	0.314	4.979	0.391
21	6	4.75	50	0.306	7.914	0.355
21	6	4.75	150	0.275	12.994	0.123
21	7	1.75	50	0.360	3.601	0.883
21	7	1.75	150	0.328	3.781	0.595
21	7	4.75	50	0.306	4.771	0.745
21	7	4.75	150	0.279	5.882	0.388
24.5	6.5	3.25	100	0.419	3.973	0.515

DO: unidades de densidad óptica

En la Tabla 29 se muestra, para cada parámetro, la arquitectura final de las redes y los índices estadísticos de ajuste de los modelos de RN en anaerobiosis (*SEP*, *RMSE*, B_f y A_f). El número de conexiones existentes en cada red también aparece en dicha tabla, indicándonos la complejidad del modelo. En la Tabla 30 aparecen los mismos índices pero referidos al modelo conjunto de RN para los tres parámetros.

Tabla 29. Errores de estimación de los parámetros de crecimiento de *L. mesenteroides* para los modelos individuales de Redes Neuronales de en anaerobiosis.

	<i>Arquitectura Red</i>	<i>RMSE</i>	<i>SEP modelo</i>	B_f	A_f	<i>N</i>
$\ln \lambda$ (h^{-1})	4:4:1	0.109	5.51	0.98	1.09	22
μ_{max} (h)	4:3:1	0.009	4.13	1.00	1.04	19
<i>y End (DO)</i>	4:3:1	0.078	14.60	0.99	1.12	13

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP modelo: % Error estándar de predicción del modelo

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

N: número de coeficientes (complejidad del modelo)

DO: unidades de densidad óptica

En la Tabla 29 se muestran los índices estadísticos que indican el adecuado ajuste de los modelos elaborados. Tanto el estadístico *RMSE* como el error *SEP*, presentan valores reducidos para los tres parámetros de crecimiento, destacando principalmente los mínimos errores para μ_{max} y λ , siendo *RMSE* inferior a 0.080 y *SEP* alrededor del 5%. Los índices sesgo (B_f) y exactitud (A_f) nos indican, por su proximidad a la unidad, que existe un buen ajuste entre los datos calculados a partir de los modelos de RN y los datos experimentales. Es importante destacar que los valores del B_f para los parámetros μ_{max} y λ son 1.00 y 0.98 respectivamente, lo cual nos indica que ambos modelos nos proporcionan una predicción adecuada desde el punto de vista comercial.

Para el modelo asociado de Redes Neuronales en anaerobiosis (Tabla 30), se observan unos errores de estimación reducidos, destacando los valores para la tasa máxima de crecimiento, $RMSE= 0.008$ y $SEP= 3.65\%$, indicativos del buen ajuste de los modelos elaborados.

Los índices B_f y A_f presentan para los tres parámetros cinéticos valores muy cercanos a la unidad, mostrando pues el adecuado ajuste entre los valores experimentales y los valores estimados por los modelos (Tabla 30).

Tabla 30. Errores de estimación de los parámetros de crecimiento de *L. mesenteroides* para el modelo asociado de Redes Neuronales en anaerobiosis.

Arquitectura Red		RMSE	SEP modelo	B_f	A_f	N
4:6:3	$Ln \lambda (h^{-1})$	0.112	5.63	1.01	1.09	47
	$\mu_{max} (h)$	0.009	4.31	0.99	1.04	
	$yEnd (DO)$	0.068	12.81	1.00	1.10	

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP modelo: % Error estándar de predicción del modelo

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

N: número de coeficientes (complejidad del modelo)

DO: unidades de densidad óptica

Se realizó la validación interna o generalización, utilizando el 25% del total de los datos, es decir, las réplicas de los valores observados para λ , μ_{max} e $yEnd$ en las mismas condiciones experimentales que las utilizadas para elaborar los modelos. Los valores obtenidos para los índices SEP, B_f y A_f en anaerobiosis para los tres parámetros cinéticos fueron similares a los resultantes con los datos del modelo, tanto para los modelos individuales como para el conjunto o asociado. Los valores del error SEP fueron reducidos, siendo $\lambda= 6.55\%$, $\mu_{max}= 3.77\%$ y $yEnd= 14.15\%$ para los modelos de RN individual y $\lambda= 6.73\%$, $\mu_{max}= 4.18\%$ y $yEnd= 12.70\%$ para el modelo de RN asociado o conjunto. Los índices sesgo fueron próximos o iguales a 1, con valores $B_f \approx 0.98$, 1.00 y 0.95 para λ , μ_{max} e $yEnd$ respectivamente, indicando un adecuado ajuste entre las observaciones y las estimaciones. Resultados algo superiores se observaron para el factor A_f , variando entre 1.04 y 1.13.

Al igual que en aerobiosis, se realizó un completo análisis estadístico para establecer cual de los modelos de RN en anaerobiosis, individual o conjunto, fue más adecuado para su aplicación.

Para los tres parámetros cinéticos, se observó que la suma del número de conexiones de los modelos individuales, 17.2 (para λ), 19.6 (para μ_{max}) y 13.4 (para $yEnd$), es decir, 50.2, fue superior al número de conexiones del conjunto, 47.8.

Para el parámetro cinético **fase de adaptación**, sin embargo, siendo $\alpha = 0.05$, la media del SEP de generalización del modelo individual fue menor aunque no significativamente (6.34 frente a 6.50) y además la desviación estándar fue significativamente inferior (9.95×10^{-4} frente a 2.66×10^{-3}).

Para la **tasa máxima de crecimiento**, la media del SEP de generalización del modelo individual fue inferior al modelo conjunto (4.47 frente a 5.23) aunque no significativamente y así como las menores desviaciones típicas del modelo individual (5.98×10^{-3} frente a 1.46×10^{-2}).

Por último, para la **densidad máxima de población**, el modelo conjunto presentó menor número de conexiones que la suma de las conexiones de los modelos individuales (47.8 frente a 50.2). Además el modelo conjunto presentó una media del SEP de generalización inferior al modelo individual (20.86 frente a 23.20), aunque no significativamente, siendo además las desviaciones típicas inferiores aunque tampoco significativamente (1.99×10^{-2} frente a 2.07×10^{-2}).

Por todo lo expuesto anteriormente, únicamente para la densidad máxima de población se observó claramente que el modelo más adecuado fue el modelo asociado o conjunto, mientras que para la fase de adaptación y la tasa máxima de crecimiento, no se observó un claro criterio de elección, por lo que, tanto el modelo individual como el conjunto fueron adecuados para describir dichos parámetros cinéticos.

5.3. Validación de los modelos predictivos

Antes de aplicar un modelo predictivo desarrollado a una situación práctica, es fundamental realizar su validación, para, de esta forma, determinar que el modelo predice con exactitud el comportamiento del microorganismo estudiado en los alimentos. Por tanto, esta fase es considerada como una etapa crítica para establecer la fiabilidad o bondad de ajuste de un modelo (Whiting, 1997).

Esta validación de los modelos predictivos incluye la validación matemática, la validación en productos cárnicos, la validación en jugo cárnico, la validación con el programa informático Food MicroModel (FMM) y la validación con datos recogidos en la literatura.

En todos los casos, los modelos han sido validados mediante el cálculo de índices matemáticos y estadísticos, y de forma adicional, para la validación matemática y validación en el alimento, mediante representaciones gráficas.

5.3.1. Validación matemática

Para muchos autores esta fase es considerada como parte de la elaboración del modelo predictivo (Van Impe y col., 1998). La validación matemática se ha realizado con nuevos datos experimentales (“extras”) obtenidos en condiciones de temperatura, sal, pH y nitritos distintas a las del modelo, pero dentro de los rangos establecidos. Para obtener estos nuevos valores se siguió la misma metodología experimental que en el caso del modelo, es decir, realizar medidas del crecimiento de *L. mesenteroides mesenteroides* en caldo de cultivo mediante turbidimetría. Las condiciones adicionales utilizadas para llevar a cabo la validación matemática aparecen en la Tabla 9 de Material y Métodos.

5.3.1.1. Representación gráfica

La comparación gráfica es el primer método utilizado para evaluar la bondad de ajuste de los modelos predictivos elaborados para *L. mesenteroides*, al enfrentar los valores de los parámetros cinéticos observados y los estimados por los modelos. Además, las representaciones gráficas aportan información acerca de aquellos modelos que al ser aplicados, podrían estimar respuestas de crecimiento no seguras.

Para el parámetro cinético *fase de adaptación*, se obtuvieron los valores experimentales y los predictivos por los diferentes modelos en aerobiosis y anaerobiosis (Tablas 31 y 34), y fueron representados en forma lineal y mediante transformaciones de raíz cuadrada y logaritmo decimal (Figuras 23 (a), (b), (c) respectivamente). En general, se observó buena concordancia para los tres modelos (RS; RN individual y RN conjunto) entre los valores observados y predictivos a lo largo del rango de las condiciones de crecimiento, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

La evaluación de estas representaciones gráficas sugiere que la transformación de raíz cuadrada fue la más conveniente, ya que los datos se distribuyeron de forma más homogénea, acercándose más a la línea de equivalencia respecto a las otras gráficas. Comparando las Figuras 23, la ventaja de representar la λ transformada es que los puntos se encuentran menos dispersos, sin embargo, una desventaja es que las desviaciones estructurales que representan la tendencia de los datos, como se pueden observar en la Figura 23 (a), aparecen en menor medida en las representaciones de raíz cuadrada y logarítmica, por lo que es recomendable examinar los datos sin transformar y los datos transformados. Se observan las desviaciones estructurales del conjunto de datos, donde una importante parte de las predicciones obtenidas con los modelos sobrestiman la duración de la fase de adaptación predictiva, que es superior a la descrita por *L. mesenteroides*.

En relación a la ***tasa máxima de crecimiento***, los valores experimentales y los estimados por los diferentes modelos en aerobiosis y anaerobiosis (Tablas 32 y 35), fueron representados y se muestran en las Figuras 24. Al igual que se hizo con la fase de adaptación, se representaron los pares de valores en forma lineal, y transformaciones de raíz cuadrada y de logaritmo decimal.

Se comprobó que las transformaciones de raíz cuadrada (Figura 24 (b)) y logarítmica (Figura 24 (c)) describieron un menor error de distribución. Coincidiendo con los resultados obtenidos para la λ , la representación de raíz cuadrada es la más adecuada ya que los valores estuvieron más agrupados a lo largo de la línea de concordancia perfecta.

En general las predicciones obtenidas por los tres modelos se asemejaron a las observaciones experimentales (Figura 24 (a)), si bien la mayor concordancia se observó al emplear los modelos predictivos de RN individual y conjunto, para los que gran parte de los puntos se sitúan en la misma línea de equivalencia. En esta misma figura se muestran las desviaciones de las predicciones para μ_{max} , predominando en este caso las estimaciones que sobrestiman el crecimiento de *L. mesenteroides*.

Por último, se realizaron las representaciones gráficas de los valores predictivos y observados (Tablas 33 y 36 en aerobiosis y anaerobiosis respectivamente) para el parámetro *densidad máxima de población*, como forma de validar matemáticamente los modelos elaborados (Figuras 25). Todas las figuras mostraron una distribución homogénea y cercana a la línea de equivalencia, tanto para los valores en atmósfera aeróbica como anaeróbica, aunque la transformación de raíz cuadrada (Figura 25 (b)) es la que presentó los datos menos dispersos.

En general, la coincidencia observada para y_{End} entre los valores observados y los estimados por los modelos, es elevada. Según lo mostrado en la Figura 25 (b), comprobamos como los modelos de RS y de RN individual para aerobiosis y anaerobiosis respectivamente, fueron los que presentaron mayor concordancia entre los pares de valores, situándose cercanos o en la misma línea de equivalencia.

En la Figura 25 (a), se refleja la tendencia de subestimación de buena parte de las predicciones, que se situaron por debajo de la línea de equivalencia, lo que significa que los valores observados fueron superiores a los estimados por los modelos.

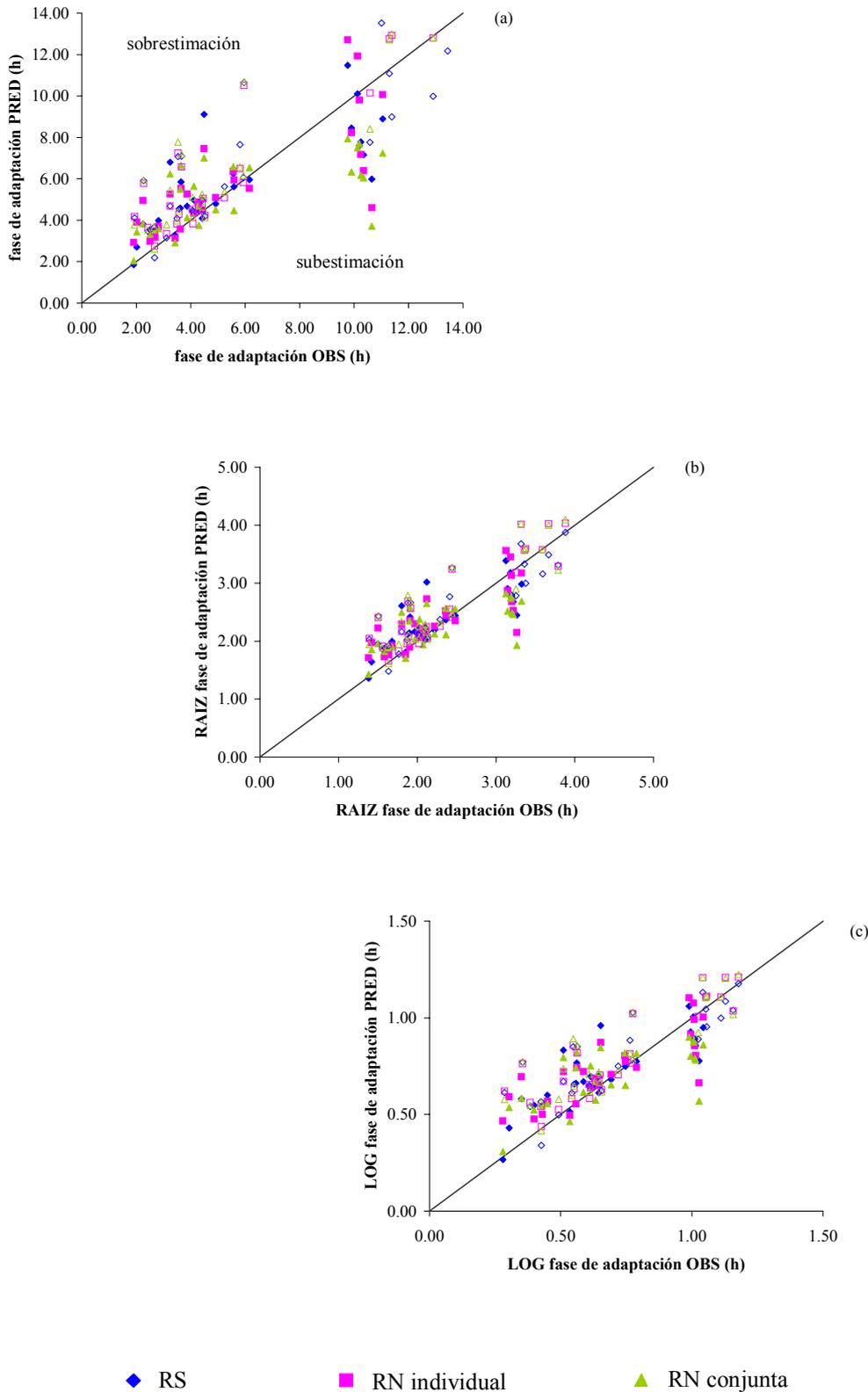


Figura 23. Representación gráfica de la fase de adaptación (h) de *L. mesenteroides* observada y predictiva por los modelos matemáticos en escala lineal (a), transformada a raíz cuadrada (b) y transformada a logaritmo decimal (c). Puntos con relleno: aerobiosis. Puntos vacíos: anaerobiosis.

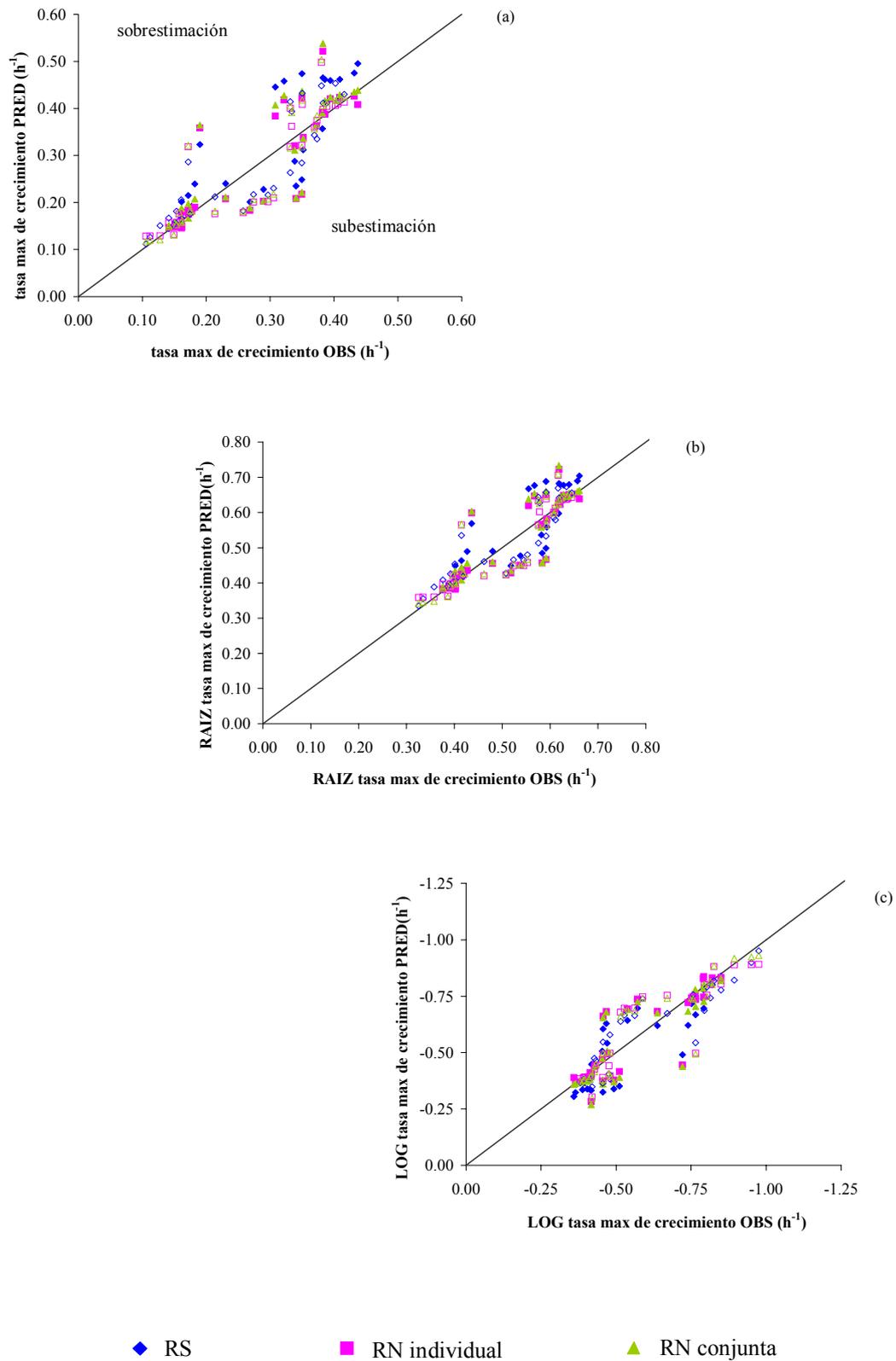


Figura 24. Representación gráfica de la tasa máxima específica de crecimiento (h^{-1}) de *L. mesenteroides* observada y predictiva por los modelos matemáticos en escala lineal (a), transformada a raíz cuadrada (b) y transformada a logaritmo decimal (c). Puntos con relleno: aerobiosis. Puntos vacíos: anaerobiosis.

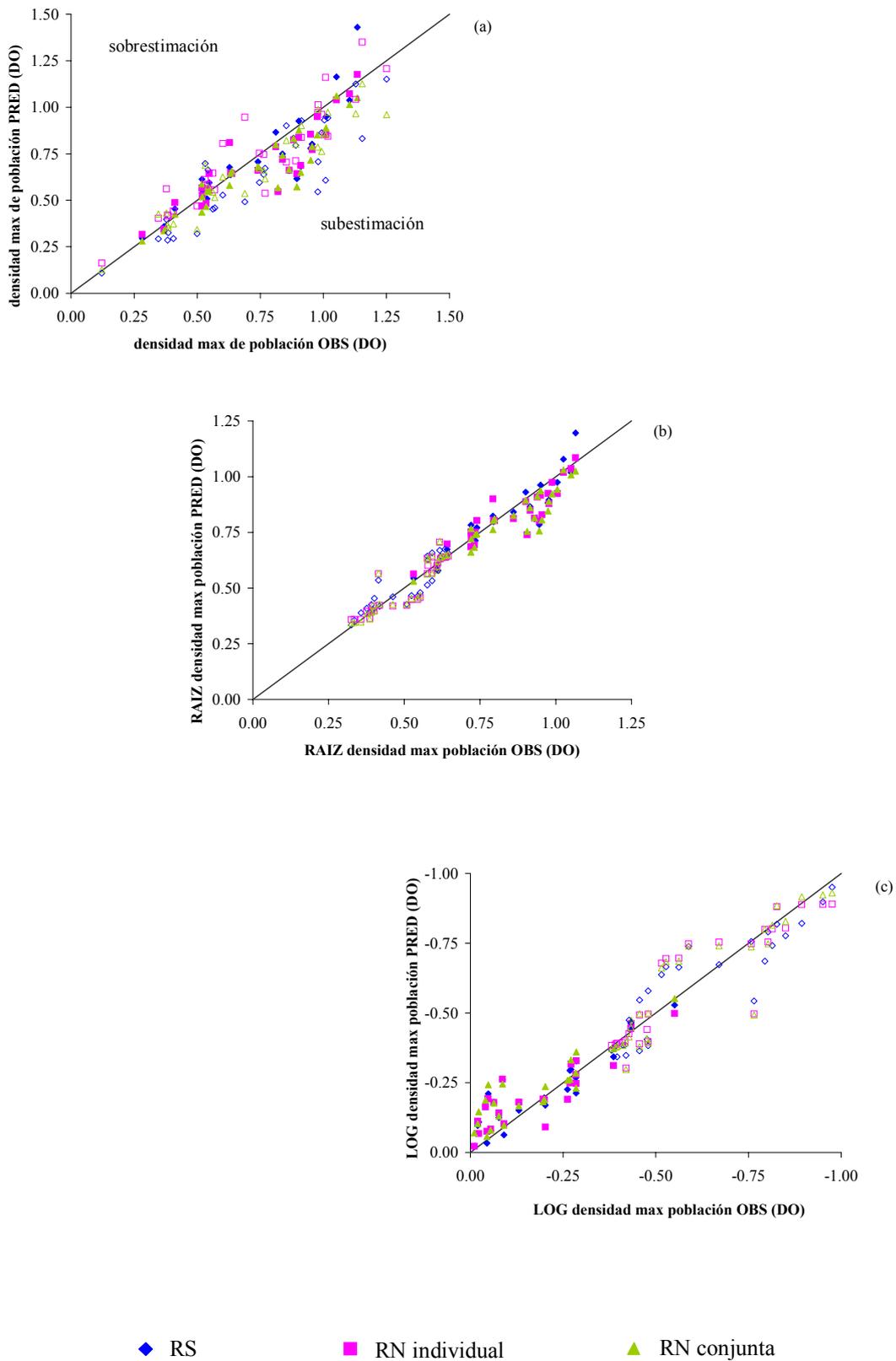


Figura 25. Representación gráfica de la densidad máxima de población (DO) de *L. mesenteroides* observada y predictiva por los modelos matemáticos en escala lineal (a), transformada a raíz cuadrada (b) y transformada a logaritmo decimal (c). Puntos con relleno: aerobiosis. Puntos vacíos: anaerobiosis.

5.3.1.2. Índices matemáticos y estadísticos

Según Ross (1996) para evaluar la fiabilidad de los modelos predictivos lo más apropiado es emplear datos obtenidos en condiciones experimentales bien controladas, como es el caso de condiciones adicionales obtenidas de la misma forma que las necesarias para la elaboración del modelo. De acuerdo con esto, en este estudio se realizaron condiciones experimentales extras, donde se determinó el crecimiento turbidimétrico de *L. mesenteroides* en caldo MRS en diversas condiciones experimentales (temperatura, pH, NaCl y NaNO₂) y en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis (Tabla 10).

La validación matemática fue cuantificada por medio del cálculo de los índices A_f y B_f , los cuales proporcionan un objetivo resumen de la fiabilidad de los modelos predictivos en microbiología de alimentos (Ross, 1996). También se empleó el estadístico *RMSE* y *SEP* para evaluar la bondad de ajuste de los modelos.

Para realizar la comparación matemática se enfrentaron los valores observados para cada uno de los parámetros de crecimiento, descritos por *L. mesenteroides*, con las estimaciones proporcionadas por los modelos predictivos, en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

Aerobiosis

La predicción de la *fase de adaptación* posee más dificultades para modelar que la velocidad de crecimiento, ya que depende de numerosos factores, como el estado fisiológico y tamaño del inóculo y de las condiciones previas de crecimiento (Robinson y col., 1998; Ross y col., 2000a), lo cual podría explicar las posibles diferencias entre los valores observados y los predictivos.

En la Tabla 31, se observa que los valores experimentales para λ de *L. mesenteroides* fueron, en general, muy similares a los valores estimados por los modelos predictivos. Los resultados obtenidos para el estadístico *RMSE* mostraron desviaciones reducidas para los tres modelos, con valores entre 0.322 y 0.403. Con relación a los valores del B_f , se observa que el modelo de RN asociado o conjunto fue el que mejor estimó la fase de adaptación, ya que presenta un valor de 1.02, y para el resto de modelos, RS y RN individual, también fueron próximos a 1 ($B_f = 1.10$ y 1.12 respectivamente). Estos índices, superiores a la unidad, nos indican que las predicciones

obtenidas con estos modelos sobrestiman la fase de adaptación, ya que los valores estimados son más elevados que los observados.

En la Tabla 31 observamos que la mayor exactitud en las predicciones se produjo al aplicar el modelo de RS ($A_f= 1.28$), seguido por el modelo de RN individual ($A_f= 1.31$), pues mostraron los índices más reducidos y cercanos a la unidad.

En la literatura se han encontrado numerosos estudios científicos que hacen referencia a los índices de validación matemática, B_f y A_f , para la fase de adaptación de diversos microorganismos. Barco (2001) realizó un estudio con *E. coli* O157: H7, en el cual las estimaciones más ajustadas se obtuvieron mediante el modelo de Regresión ($B_f= 0.88$ y $A_f= 1.54$). Para este mismo parámetro y el microorganismo patógeno *S. aureus*, Castillejo (2002) observó valores para los índices de validación de $B_f=1.13$ y $A_f= 1.71$ mediante el modelo de Respuesta en Superficie en aerobiosis. Como se puede observar, los índices obtenidos en nuestro estudio se sitúan dentro del rango descrito por estos autores, e incluso son mejores, ya que se aproximan más a la unidad.

Para el parámetro ***tasa máxima de crecimiento*** se han comparado los valores observados por *L. mesenteroides* en caldo de cultivo con las estimaciones proporcionadas por los modelos elaborados. Como se puede observar en la Tabla 32, los valores observados para la μ_{max} son, en prácticamente todos los casos, inferiores a los valores predictivos obtenidos con los modelos, lo que se traduce en la obtención de predicciones adecuadas desde el punto de vista sensorial y comercial.

El estadístico *RMSE* fue calculado, mostrando valores muy reducidos (Tabla 32), siendo inferiores a 0.070 para todos los modelos predictivos, debido a las menores desviaciones encontradas entre los datos experimentales y los estimados.

El índice sesgo, B_f , fue próximo a 1 y muy similar para los tres modelos, si bien el que presentó un mejor ajuste fue el modelo de RN conjunto, con valor para el factor $B_f=1.01$ (Tabla 32). También se observan valores para el índice A_f cercanos a la unidad, variando en un rango entre 1.16- 1.20 según el modelo predictivo, lo que indica que se sobrestima la tasa de crecimiento en un 16%-20%.

Según los resultados obtenidos al realizar la validación matemática, el modelo de RN conjunto es el más adecuado para estimar el parámetro μ_{max} en atmósfera aeróbica.

En otros trabajos se han descrito valores para los índices sesgo y exactitud muy similares a los obtenidos en nuestro estudio. Lebert y col. (2000) observaron elevados ajustes al realizar la validación matemática para los modelos que estiman el **tiempo de generación** (inversa de la tasa máxima de crecimiento) de *Pseudomonas ssp.* ($B_f = 0.82-1.16$ y $A_f = 1.13-1.24$). Para el mismo microorganismo, en otro estudio se han publicado valores similares para la predicción de este parámetro, siendo el $B_f = 0.84$ y $A_f = 1.23$ (Neumeyer y col., 1997b).

En relación con la **tasa máxima de crecimiento**, Barco (2001), obtuvo adecuados valores de $B_f = 0.90$ y $A_f = 1.39$ en la validación matemática de los modelos predictivos desarrollados para *E. coli* O157:H7, mientras que Castillejo (2002) describió valores de $B_f = 0.99$ y $A_f = 1.37$ para *S. aureus* en aerobiosis.

En otro estudio llevado a cabo con mohos alterantes, para la tasa máxima de crecimiento, se observaron valores muy próximos a la unidad, $B_f = 1.01-1.02$ y $A_f = 1.07-1.11$, mostrando el ajuste y exactitud del modelo elaborado (Valík y Piecková, 2001). Arinder y Borch (1999) observaron valores para los índices $B_f = 1.02$ y $A_f = 1.36$ para la tasa de crecimiento de *Pseudomonas sp.*

Tabla 31. Valores observados (OBS) y predictivos para la fase de adaptación (λ , h) de *L. mesenteroides* obtenidos con los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y de Redes Neuronales (RN) utilizados para la validación matemática en aerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	λ <i>OBS</i> (h)	λ <i>RS</i>	λ <i>RN individual</i>	λ <i>RN conjunto</i>
10.5	6.5	0.25	50	10.65	5.99	4.60	3.71
10.5	6.5	1.75	0	10.35	7.16	6.39	6.05
10.5	6.5	1.75	50	10.25	7.78	7.18	6.17
10.5	6.5	1.75	100	9.90	8.45	8.24	6.33
10.5	6.5	3.25	0	11.05	8.89	10.07	7.23
10.5	6.5	3.25	50	10.12	10.10	11.93	7.50
10.5	6.5	3.25	100	9.76	11.48	12.70	7.93
14	7	1.75	0	3.24	6.80	5.26	6.23
14	7	4.75	0	10.19	7.61	9.81	7.70
17.5	6.5	0.25	50	2.50	3.53	2.99	3.34
17.5	6.5	1.75	50	3.61	4.58	3.58	5.51
17.5	6.5	1.75	100	4.11	4.98	4.34	5.64
17.5	6.5	3.25	50	6.16	5.95	5.55	6.54
17.5	6	1.75	50	4.42	4.09	4.48	5.07
17.5	6	3.25	50	5.56	6.24	6.35	6.59
17.5	7	3.25	50	3.64	5.85	5.54	6.65
21	6	3.25	50	4.92	4.79	5.10	4.50
21	7	3.25	50	4.27	4.49	4.87	4.69
21	6	0.25	0	1.90	1.85	2.93	2.03
21	6	1.75	0	2.01	2.70	3.90	3.44
24.5	6.5	3.25	100	2.81	3.98	3.70	3.60
24.5	6.5	3.25	50	2.69	3.51	3.16	3.51
24.5	6.5	3.25	150	4.30	4.52	4.66	3.75
24.5	6	1.75	150	3.43	3.27	3.13	2.91
24.5	6	4.75	50	5.58	5.61	5.95	4.47
24.5	6	4.75	150	4.49	9.11	7.46	7.01
24.5	7	4.75	50	2.24	3.81	4.95	3.84
24.5	7	4.75	150	3.87	4.68	5.27	4.12
				RMSE	0.322	0.357	0.403
				SEP	27.63	30.63	34.59
				B_f	1.10	1.12	1.02
				A_f	1.28	1.31	1.39

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP: % error estándar de predicción

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

Tabla 32. Valores observados (OBS) y predictivos para la tasa máxima específica de crecimiento ($\mu_{max} h^{-1}$) de *L. mesenteroides* obtenidos con los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y de Redes Neuronales (RN), utilizados para la validación matemática en aerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	μ_{max} OBS (h^{-1})	μ_{max} RS	μ_{max} RN individual	μ_{max} RN conjunto
10.5	6.5	0.25	50	0.190	0.323	0.359	0.365
10.5	6.5	1.75	0	0.182	0.239	0.190	0.207
10.5	6.5	1.75	50	0.172	0.215	0.184	0.197
10.5	6.5	1.75	100	0.161	0.201	0.179	0.188
10.5	6.5	3.25	0	0.162	0.183	0.148	0.164
10.5	6.5	3.25	50	0.151	0.158	0.148	0.158
10.5	6.5	3.25	100	0.141	0.145	0.147	0.152
14	7	1.75	0	0.230	0.240	0.208	0.211
14	7	4.75	0	0.161	0.167	0.146	0.158
17.5	6.5	0.25	50	0.382	0.357	0.392	0.390
17.5	6.5	1.75	50	0.350	0.249	0.218	0.222
17.5	6.5	1.75	100	0.341	0.235	0.208	0.210
17.5	6.5	3.25	50	0.177	0.192	0.181	0.181
17.5	6	1.75	50	0.290	0.228	0.203	0.204
17.5	6	3.25	50	0.172	0.177	0.175	0.166
17.5	7	3.25	50	0.268	0.201	0.183	0.189
21	6	3.25	50	0.339	0.288	0.321	0.311
21	7	3.25	50	0.352	0.312	0.339	0.336
21	6	0.25	0	0.383	0.465	0.522	0.538
21	6	1.75	0	0.372	0.363	0.363	0.365
24.5	6.5	3.25	100	0.409	0.462	0.424	0.429
24.5	6.5	3.25	50	0.432	0.475	0.426	0.435
24.5	6.5	3.25	150	0.394	0.459	0.421	0.424
24.5	6	1.75	150	0.437	0.495	0.408	0.439
24.5	6	4.75	50	0.386	0.462	0.388	0.416
24.5	6	4.75	150	0.308	0.446	0.384	0.407
24.5	7	4.75	50	0.350	0.474	0.422	0.436
24.5	7	4.75	150	0.322	0.458	0.418	0.427
				RMSE	0.070	0.066	0.070
				SEP	22.88	21.71	22.99
				B_f	1.07	0.99	1.01
				A_f	1.20	1.16	1.16

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP: % error estándar de predicción

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

Tabla 33. Valores observados (OBS) y predictivos para la densidad máxima de población (DMP, DO) de *L. mesenteroides* obtenidos con los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y de Redes Neuronales (RN), utilizados para la validación matemática en aerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	<i>yEnd</i> OBS (DO)	<i>yEnd</i> RS	<i>yEnd</i> RN individual	<i>yEnd</i> RN conjunto
10.5	6.5	0.25	50	0.628	0.677	0.810	0.580
10.5	6.5	1.75	0	0.950	0.779	0.855	0.715
10.5	6.5	1.75	50	0.547	0.594	0.645	0.551
10.5	6.5	1.75	100	0.411	0.454	0.488	0.425
10.5	6.5	3.25	0	0.895	0.616	0.643	0.572
10.5	6.5	3.25	50	0.518	0.470	0.469	0.436
10.5	6.5	3.25	100	0.368	0.359	0.345	0.336
14	7	1.75	0	1.104	1.038	1.073	1.015
14	7	4.75	0	0.910	0.682	0.687	0.650
17.5	6.5	0.25	50	0.976	0.950	0.949	0.851
17.5	6.5	1.75	50	0.882	0.834	0.825	0.832
17.5	6.5	1.75	100	0.632	0.637	0.647	0.645
17.5	6.5	3.25	50	0.864	0.660	0.662	0.666
17.5	6	1.75	50	0.838	0.749	0.721	0.740
17.5	6	3.25	50	0.820	0.549	0.546	0.568
17.5	7	3.25	50	0.955	0.801	0.772	0.790
21	6	3.25	50	0.637	0.650	0.643	0.658
21	7	3.25	50	1.011	0.949	0.854	0.889
21	6	0.25	0	1.135	1.430	1.176	1.051
21	6	1.75	0	1.052	1.163	1.039	1.061
24.5	6.5	3.25	100	0.740	0.707	0.660	0.681
24.5	6.5	3.25	50	0.903	0.926	0.839	0.877
24.5	6.5	3.25	150	0.520	0.540	0.525	0.518
24.5	6	1.75	150	0.519	0.613	0.566	0.588
24.5	6	4.75	50	0.539	0.508	0.564	0.547
24.5	6	4.75	150	0.281	0.296	0.317	0.281
24.5	7	4.75	50	0.812	0.865	0.788	0.799
24.5	7	4.75	150	0.536	0.504	0.483	0.466
				RMSE	0.130	0.119	0.127
				SEP	15.62	14.37	15.34
				B_f	0.96	0.95	0.91
				A_f	1.13	1.14	1.14

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP: % error estándar de predicción

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

DO: densidad óptica

La **densidad máxima de población** es un parámetro cinético que no ha sido frecuentemente modelado en la microbiología predictiva. En la mayoría de los trabajos científicos, el parámetro y_{End} únicamente es estimado utilizando las ecuaciones de Gompertz (Gibson y col., 1987; 1988) para diversos microorganismos patógenos y alterantes, (Bennik y col., 1995; Buchanan y Bagi, 1997; Giannuzzi y col., 1998; Masson y col., 2002) o mediante la ecuación de Baranyi (Baranyi y col., 1993a; Baranyi y Roberts, 1994), (Valero y Salmerón, 2002; Jacxsens y col., 2003; Coleman y col., 2002; Valero y col., 2003). Sin embargo, son escasos los estudios en los cuales el parámetro densidad máxima de población es incluido en los modelos predictivos; tal es el caso del modelo desarrollado para *Staphylococcus aureus* (McCann y col., 2003) y del modelo descrito para *Bacillus cereus* (Nauta y col., 2003).

En la Tabla 33 se presentan los valores experimentales y los predictivos por los modelos matemáticos para este parámetro y se observa una aceptable coincidencia entre estos valores para los tres modelos. Este hecho se comprueba también con los resultados obtenidos para el estadístico *RMSE* (Tabla 33), que muestran valores reducidos, entre 0.119- 0.130.

Los valores del índice B_f fueron muy similares para los tres modelos, mostrando que los de RS y RN individuales son los que mejor ajustan el parámetro y_{End} , ya que presentan valores próximos a la unidad ($B_f \approx 0.95$), aunque subestiman la respuesta de *L. mesenteroides*. En la Tabla 33 se muestra el factor A_f calculado a partir de los diferentes modelos predictivos en atmósfera aeróbica y se observaron valores que mostraron exactitud en las predicciones $A_f \approx 1.14$.

Llaudes y col. (2001), en relación con el **tiempo en alcanzar la alteración** para el microorganismo alterante *Bacillus stearothermophilus*, observaron un buen ajuste entre los valores observados y los predictivos, siendo el $B_f = 0.90-1.05$ y $A_f = 1.15- 1.18$, siendo resultados muy similares a los obtenidos en nuestro estudio.

En la validación matemática de los modelos predictivos, diversos autores han considerado como aceptables unos valores para el B_f entre 0.70- 1.15 para microorganismos patógenos (Ross, 1999) y B_f entre 0.80-1.30 para microorganismos alterantes en productos de la pesca (Dalgaard, 2000). Según estos criterios, cada uno de los modelos elaborados (RS, RN individual y RN conjunto) se pueden considerar adecuados para describir el crecimiento de *L. mesenteroides* en caldo de cultivo.

Como resumen de la **validación matemática en aerobiosis**, seleccionamos el modelo de RN individual como el que mejor estima los parámetros cinéticos μ_{max} e y_{End} , ya que presentaron menores errores de estimación (*RMSE* y *SEP*) y valores más próximos a la unidad para los índices B_f y A_f (Tablas 32 y 33), aunque no existen grandes diferencias con el resto de los modelos. En cuanto al parámetro λ , tanto el modelo de RN individual como el de RS estiman adecuadamente este parámetro, si bien el modelo de RS presentó valores algo más ajustados (Tabla 31).

Anaerobiosis

Para la **fase de adaptación** en atmósfera anaeróbica, al igual que ocurría en aerobiosis, los valores observados de *L. mesenteroides* en caldo MRS son inferiores a los valores estimados por los modelos matemáticos.

Los índices matemáticos obtenidos para este parámetro de crecimiento en anaerobiosis se muestran en la Tabla 34. Los valores del estadístico *RMSE* indican un buen ajuste entre los valores observados y estimados, con valores inferiores a 0.382.

Para los índices sesgo y exactitud se obtuvieron valores muy similares para los tres parámetros (Tabla 34), siendo los más cercanos a la unidad los correspondientes al modelo de RS ($B_f= 1.18$) y al modelo de RN individual ($A_f= 1.29$) y que sobrestiman la fase de adaptación de *L. mesenteroides* con respecto a las observaciones experimentales.

Tabla 34. Valores observados (OBS) y predictivos para la fase de adaptación (λ , h) de *L. mesenteroides* obtenidos con los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y de Redes Neuronales (RN) utilizados para la validación matemática en anaerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	λ <i>OBS</i> (h)	λ <i>RS</i>	λ <i>RN individual</i>	λ <i>RN conjunto</i>
10.5	6.5	0.25	50	10.58	7.76	10.15	8.41
10.5	6.5	1.75	0	11.39	8.99	12.92	12.99
10.5	6.5	1.75	50	12.91	9.98	12.79	12.80
10.5	6.5	1.75	100	11.29	11.09	12.77	12.71
10.5	6.5	3.25	0	13.44	12.18	16.19	16.01
10.5	6.5	3.25	50	11.01	13.52	16.12	16.21
10.5	6.5	3.25	100	15.06	15.02	16.27	16.78
14	7	1.75	0	3.53	7.08	7.24	7.78
14	7	4.75	0	14.36	10.96	10.84	10.40
17.5	6.5	0.25	50	2.42	3.48	3.64	3.53
17.5	6.5	1.75	50	4.06	4.47	4.51	5.11
17.5	6.5	1.75	100	4.41	4.97	4.78	5.25
17.5	6.5	3.25	50	5.93	6.06	5.82	6.16
17.5	6	1.75	50	3.24	4.69	4.68	5.45
17.5	6	3.25	50	3.66	7.10	6.58	7.19
17.5	7	3.25	50	2.26	5.91	5.79	5.93
21	6	3.25	50	5.24	5.62	5.08	5.35
21	7	3.25	50	4.52	4.20	4.23	4.13
21	6	0.25	0	2.67	2.19	2.74	2.61
21	6	1.75	0	3.11	3.15	3.35	3.79
24.5	6.5	3.25	100	3.49	4.09	3.82	3.97
24.5	6.5	3.25	50	2.66	3.68	3.47	3.66
24.5	6.5	3.25	150	3.56	4.54	4.29	4.44
24.5	6	1.75	150	4.08	4.41	3.83	4.16
24.5	6	4.75	50	5.81	7.65	6.50	6.57
24.5	6	4.75	150	5.96	10.65	10.51	10.70
24.5	7	4.75	50	1.93	4.11	4.18	3.78
24.5	7	4.75	150	4.46	4.50	5.06	4.63
				RMSE	0.371	0.359	0.382
				SEP	27.28	26.41	28.10
				B_f	1.18	1.23	1.26
				A_f	1.31	1.29	1.33

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP: % error estándar de predicción

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

Tabla 35. Valores observados (OBS) y predictivos para la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max} h^{-1}) de *L. mesenteroides* obtenidos con los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y de Redes Neuronales (RN), utilizados para la validación matemática en anaerobiosis.

<i>T</i> (°C)	<i>pH</i>	<i>NaCl</i> (%)	<i>NaNO₂</i> (ppm)	μ_{max} OBS (h^{-1})	μ_{max} RS	μ_{max} RN individual	μ_{max} RN conjunto
10.5	6.5	0.25	50	0.172	0.286	0.318	0.321
10.5	6.5	1.75	0	0.161	0.206	0.159	0.158
10.5	6.5	1.75	50	0.153	0.181	0.158	0.153
10.5	6.5	1.75	100	0.141	0.167	0.157	0.149
10.5	6.5	3.25	0	0.128	0.151	0.129	0.121
10.5	6.5	3.25	50	0.112	0.126	0.129	0.119
10.5	6.5	3.25	100	0.106	0.112	0.129	0.117
14	7	1.75	0	0.214	0.212	0.176	0.181
14	7	4.75	0	0.149	0.152	0.131	0.130
17.5	6.5	0.25	50	0.374	0.335	0.375	0.385
17.5	6.5	1.75	50	0.305	0.230	0.210	0.218
17.5	6.5	1.75	100	0.297	0.216	0.202	0.207
17.5	6.5	3.25	50	0.175	0.175	0.179	0.183
17.5	6	1.75	50	0.274	0.217	0.201	0.206
17.5	6	3.25	50	0.157	0.162	0.176	0.179
17.5	7	3.25	50	0.258	0.183	0.179	0.182
21	6	3.25	50	0.332	0.264	0.319	0.316
21	7	3.25	50	0.350	0.284	0.322	0.318
21	6	0.25	0	0.380	0.448	0.498	0.504
21	6	1.75	0	0.369	0.343	0.360	0.356
24.5	6.5	3.25	100	0.406	0.416	0.410	0.419
24.5	6.5	3.25	50	0.416	0.430	0.413	0.425
24.5	6.5	3.25	150	0.389	0.412	0.404	0.413
24.5	6	1.75	150	0.402	0.454	0.406	0.417
24.5	6	4.75	50	0.383	0.412	0.398	0.406
24.5	6	4.75	150	0.334	0.394	0.362	0.391
24.5	7	4.75	50	0.350	0.432	0.408	0.418
24.5	7	4.75	150	0.332	0.414	0.401	0.405
				RMSE	0.052	0.054	0.055
				SEP	17.65	18.17	18.56
				B_f	1.03	1.00	1.01
				A_f	0.86	1.15	1.15

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP: % error estándar de predicción

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

Tabla 36. Valores observados (OBS) y predictivos para la densidad máxima de población (y_{End} , DO) de *L. mesenteroides* obtenidos con los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y de Redes Neuronales (RN), utilizados para la validación matemática en anaerobiosis.

T (°C)	pH	NaCl (%)	NaNO ₂ (ppm)	y_{End} OBS (DO)	y_{End} RS	y_{End} RN individual	y_{End} RN conjunto
10.5	6.5	0.25	50	0.688	0.491	0.947	0.537
10.5	6.5	1.75	0	1.009	0.608	1.161	0.852
10.5	6.5	1.75	50	0.601	0.528	0.805	0.625
10.5	6.5	1.75	100	0.378	0.397	0.562	0.432
10.5	6.5	3.25	0	0.978	0.545	0.972	0.786
10.5	6.5	3.25	50	0.562	0.453	0.645	0.545
10.5	6.5	3.25	100	0.385	0.326	0.414	0.352
14	7	1.75	0	1.154	0.832	1.350	1.126
14	7	4.75	0	0.979	0.707	1.013	0.988
17.5	6.5	0.25	50	0.994	0.863	0.962	0.763
17.5	6.5	1.75	50	0.913	0.928	0.838	0.902
17.5	6.5	1.75	100	0.532	0.698	0.612	0.687
17.5	6.5	3.25	50	0.890	0.796	0.712	0.802
17.5	6	1.75	50	0.853	0.901	0.705	0.821
17.5	6	3.25	50	0.769	0.672	0.537	0.615
17.5	7	3.25	50	1.018	0.943	0.844	0.973
21	6	3.25	50	0.543	0.663	0.587	0.574
21	7	3.25	50	1.004	0.932	0.851	0.862
21	6	0.25	0	1.250	1.151	1.208	0.960
21	6	1.75	0	1.128	1.126	1.043	0.966
24.5	6.5	3.25	100	0.570	0.459	0.555	0.515
24.5	6.5	3.25	50	0.763	0.638	0.746	0.661
24.5	6.5	3.25	150	0.383	0.285	0.421	0.366
24.5	6	1.75	150	0.346	0.292	0.403	0.426
24.5	6	4.75	50	0.500	0.320	0.469	0.343
24.5	6	4.75	150	0.122	0.108	0.163	0.126
24.5	7	4.75	50	0.747	0.595	0.753	0.670
24.5	7	4.75	150	0.406	0.294	0.442	0.373
				RMSE	0.169	0.124	0.122
				SEP	20.56	15.09	14.85
				B_f	0.86	1.04	0.93
				A_f	1.22	1.16	1.14

RMSE: raíz del error cuadrático medio

SEP: % error estándar de predicción

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

DO: densidad óptica

Para el parámetro *tasa máxima de crecimiento* se han comparado los valores observados en caldo de cultivo de *L. mesenteroides* con las predicciones realizadas por los modelos de RS y RN en anaerobiosis (Tabla 35). En general, los valores observados para μ_{max} fueron algo inferiores a los valores estimados por los modelos matemáticos.

En la Tabla 35 se observa que los valores de *RMSE* son muy reducidos, indicando pequeñas desviaciones entre los datos experimentales y predictivos. El modelo de RS es el que describe el menor valor para este estadístico, $RMSE= 0.052$, mientras que para el resto de modelos este modelo es prácticamente el mismo.

El índice sesgo, B_f , calculado para todos los modelos predictivos (Tabla 35), muestra en todos los casos valores iguales o próximos a 1, signo de que todos los modelos realizan predicciones adecuadas de la tasa de crecimiento de *L. mesenteroides*. El modelo de RN individual fue el que estimó con total exactitud el desarrollo de este microorganismo en anaerobiosis, con un valor $B_f= 1.00$, observando valores similares, 1.03 y 1.01 para los modelos de RS y RN conjunto respectivamente.

En cuanto al índice exactitud, A_f , se observó que los dos modelos de RN predicen el parámetro μ_{max} con exactitud, con un valor de 1.15, lo que indica que las predicciones exceden un 15% de las observaciones experimentales (Tabla 35).

Por último, los valores observados en caldo MRS y los predictivos por los modelos matemáticos para el parámetro cinético *densidad máxima de población* (y_{End}) de *L. mesenteroides* se muestran en la Tabla 36.

Los resultados obtenidos para el estadístico *RMSE* (Tabla 36), muestran los valores más reducidos, alrededor de 0.122, para los modelos de RN individual y conjunto.

Para el índice B_f , se observa que el modelo de RN asociado o conjunto fue el que mejor ajusta el parámetro y_{End} , ya que presenta un valor ligeramente superior a 1 ($B_f= 1.04$). Esto significa que este modelo realizó predicciones adecuadas desde el punto de vista sensorial (Tabla 36), mientras que para el resto de modelos las predicciones fueron de subestimación ($B_f < 1$). El índice A_f indica que la mayor exactitud en las predicciones se produjo al aplicar los modelos de RN individual y conjunto, con valores cercanos a la unidad, 1.16 y 1.14 respectivamente.

A modo de conclusión de la **validación matemática en anaerobiosis**, seleccionamos el modelo de RN individual como el que mejor estima los parámetros λ , μ_{max} e y_{End} , puesto que presentaron reducidos errores de estimación (*RMSE* y *SEP*) y valores iguales o próximos a 1 para los índices B_f y A_f (Tablas 34, 35 y 36), si bien para λ y μ_{max} se observan escasas diferencias entre RN individual y el resto de modelos.

5.3.2. Validación en productos cárnicos

La propiedad más importante de un modelo predictivo es la capacidad de estimar con exactitud y fiabilidad el comportamiento microbiano en los alimentos. Para todo modelo elaborado con datos obtenidos en medio de cultivo, la garantía de que el modelo es aplicable a alimentos es esencial, es decir, una vez que el modelo ha sido desarrollado se debe probar frente a observaciones recogidas en alimentos (McMeekin y col., 1993).

Para realizar este tipo de validación, las observaciones del crecimiento de BAL, como microflora natural, en productos cárnicos cocidos y envasados al vacío (jamón, pechuga de pavo y pechuga de pollo), han sido enfrentadas con las predicciones de crecimiento de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, obtenidas mediante los modelos elaborados en anaerobiosis, que simula el ambiente en ausencia de O_2 del envasado a vacío. Las curvas de crecimiento en función del tiempo de análisis obtenidas en los tres productos se ajustaron a la fórmula de Gompertz (Gibson y col., 1988) o Baranyi y Roberts (1994) mediante el programa DMFit.

5.3.2.1. Comportamiento de BAL en productos cárnicos cocidos

Los productos cárnicos cocidos son alimentos altamente perecederos, ya que sus características físico- químicas (bajo contenido en sal, $pH \approx 6.0$ y $a_w > 0.945$) son pequeñas barreras para inhibir el crecimiento microbiano. Debido a que la temperatura es el principal factor que controla el crecimiento de los microorganismos, se estudió el efecto de este factor ambiental en el crecimiento de BAL en muestras de los productos cárnicos cocidos.

Para las muestras de **pechuga de pollo** (Figura 26) se observó que no hubo fase de adaptación para ninguna de las temperaturas de estudio. El nivel inicial de BAL fue elevado en todos los casos, siendo superior a 10^4 ufc/g. En relación con el elevado

recuento inicial, podemos observar en la Figura 26 como la fase estacionaria en el crecimiento de BAL se alcanzó muy pronto, aproximadamente a los 5 días.

Estos microorganismos se multiplicaron a mayor velocidad conforme aumentó la temperatura de almacenamiento, observándose unos valores para la velocidad máxima de crecimiento de 0.044 h^{-1} a 10.5°C , 0.057 h^{-1} a 13.5°C y 0.069 h^{-1} a 17.7°C (Tabla 37).

El recuento máximo alcanzado, en todos los casos, fue superior a 10^8 ufc/g, hecho observado por otros autores en similares productos cárnicos procesados (Collins-Thompson y Rodríguez- López, 1980; Holley y McKellar, 1996; Holley, 1997a, b; López- Caballero, 1999; Anifantaki y col., 2002; Gill y Badoni, 2002).

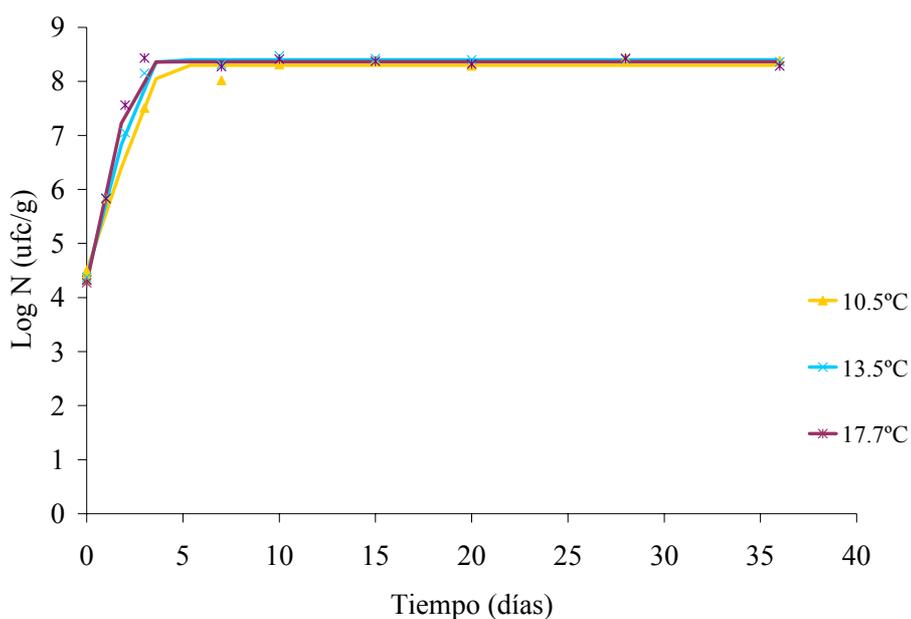


Figura 26. Curvas de crecimiento descritas por las bacterias ácido lácticas en pechuga de pollo envasado al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Tabla 37. Fase de adaptación (λ , h) y velocidad de crecimiento (μ , h^{-1}) descrita por las bacterias ácido lácticas en pechuga de pollo, pechuga de pavo y jamón cocido envasados al vacío.

T (°C)	Pollo		Pavo		Jamón	
	λ (h)	μ (h^{-1})	λ (h)	μ (h^{-1})	λ (h)	μ (h^{-1})
10.5	*	0.044	78.31	0.017	16.60	0.021
13.5	*	0.057	65.06	0.021	10.00	0.034
17.7	*	0.069	8.85	0.062	7.94	0.056

En el **pavo cocido**, a diferencia de lo observado en el pollo, el nivel inicial de BAL fue cero para todas las temperaturas (Figura 27), siendo un indicio de la escasa o nula contaminación durante el loncheado y envasado, posterior al tratamiento térmico.

En este alimento, se observó fase de adaptación en su crecimiento, que fue mayor a las dos temperaturas inferiores, 10.5 y 13.5°C, con unos valores de 78.31 h y 65.06 h respectivamente, mientras que para 17.7°C, este periodo fue tan reducido como 8.85 h.

La velocidad de crecimiento de estos microorganismos en el pavo cocido mostró diferencias según la temperatura, observando valores más elevados a las mayores temperaturas (Tabla 37).

Al igual que ocurrió en el pollo cocido, el recuento microbiano alcanzado al final del periodo de análisis fue próximo a 10^8 ufc/g. El gran incremento de las BAL es explicado por el estímulo que supone para estos microorganismos el ambiente enriquecido en CO₂, que se va creando en el envase a vacío tras el consumo del oxígeno residual por el metabolismo microbiano (Waites, 1988).

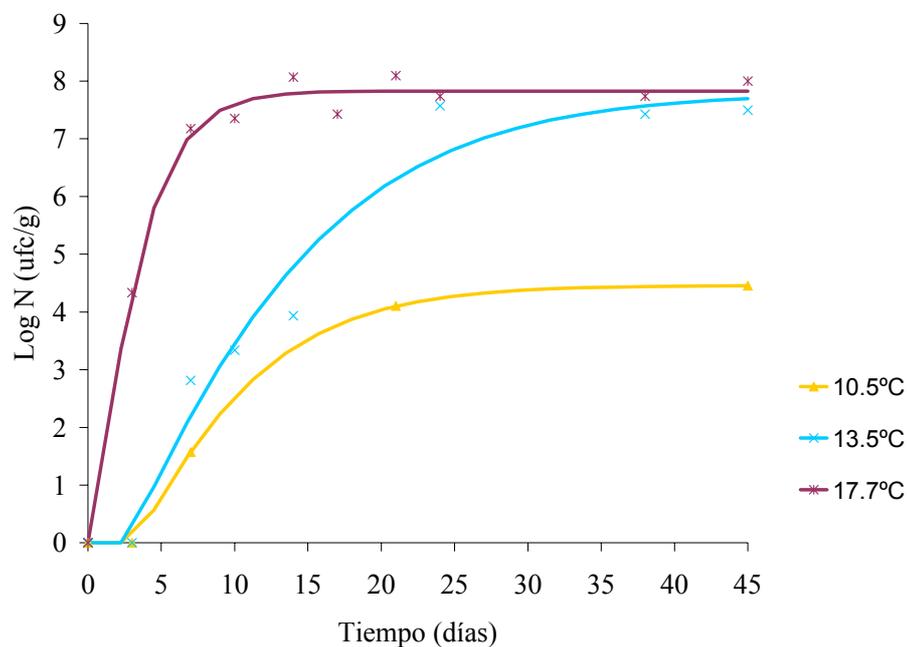


Figura 27. Curvas de crecimiento descritas por las bacterias ácido lácticas en pechuga de pavo envasado al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Por último, las BAL en el **jamón cocido**, presentaron una evolución en su crecimiento similar a la observada en el pollo cocido. De esta forma, los niveles iniciales obtenidos para las tres temperaturas fueron elevados, superiores a 5 unidades logarítmicas (Figura 28), influyendo en que la fase de estacionaria de crecimiento se alcance aproximadamente a los 10 días para todas las temperaturas.

La fase de adaptación observada en el jamón fue reducida, siendo inferior a 8 horas (Tabla 37). La velocidad de crecimiento observada en este alimento fue mayor conforme aumentó la temperatura de almacenamiento de las muestras (Tabla 37).

El recuento máximo alcanzado, al igual que ocurrió en el resto de productos cárnicos cocidos, fue muy elevado, superando el nivel de 10^8 ufc/g para todas las temperaturas estudiadas.

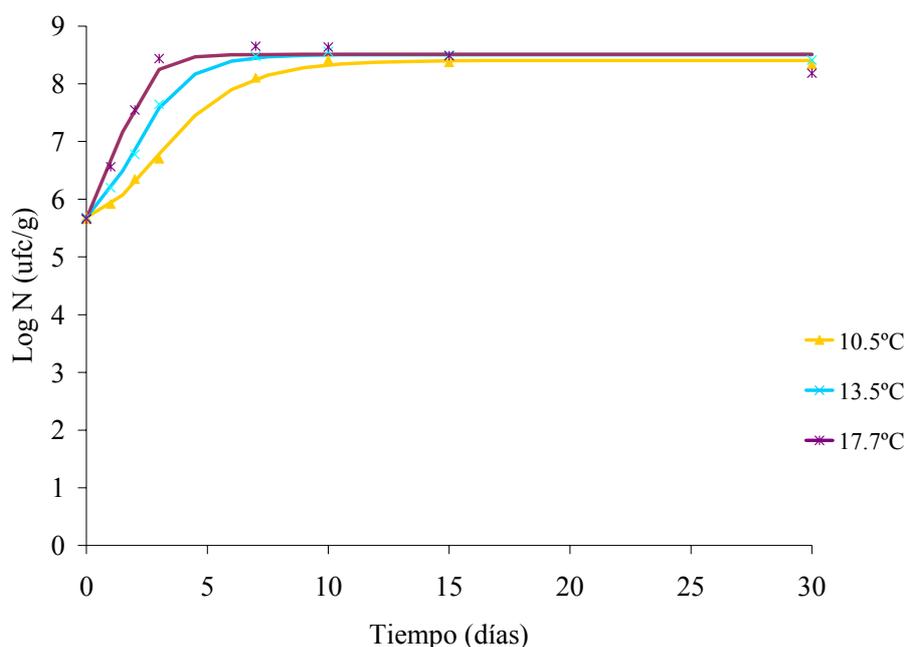


Figura 28. Curvas de crecimiento descritas por las bacterias ácido lácticas en jamón cocido envasado al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

De los tres productos cárnicos, el pollo cocido fue el que presentó una velocidad de crecimiento más elevada para todas las temperaturas, y no hubo diferencias significativas entre la velocidad del pollo y la del pavo cocido ($p > 0.05$), siendo muy similar a la temperatura más elevada, 17.7°C, 0.069 y 0.062 h^{-1} respectivamente (Tabla 37). Sin embargo, sí existieron diferencias significativas entre la velocidad de crecimiento del pollo y del jamón ($p < 0.05$). En cuanto a la duración de la fase de adaptación de las BAL se observó que fue más prolongada en el pavo, seguida por el jamón, mientras que en el pollo no se detectó.

El diferente comportamiento de BAL observado en los productos cárnicos cocidos puede ser explicado en parte por las características composicionales de los mismos (Tabla 6), cuya información es suministrada por la empresa alimentaria. Los valores de a_w (0.971-0.983) y de pH inicial (6.22-6.32) son similares en los tres productos cárnicos y favorables para el desarrollo de BAL. La concentración de NaCl en los productos cárnicos varía entre 1.76 y 2.40 %, observándose una fase de adaptación más prolongada en el pavo cocido, que contiene los niveles de sal más elevados (2.40%). Este fenómeno, es decir, el efecto de la concentración salina sobre la

fase de adaptación, fue demostrado en la sección 5.2.2.4., donde se estudió el crecimiento de *L. mesenteroides* en caldo MRS para distintas condiciones ambientales.

Otros factores que han podido influir en la menor velocidad de crecimiento de las BAL en el jamón cocido fueron los niveles más elevados de la concentración de NaNO_2 y NaNO_3 y de grasa, siendo 30 y 75 ppm y 6.40 % respectivamente (Tabla 6), comparado con los productos derivados de carne de ave.

Se determinó la evolución del pH en las muestras de los productos cárnicos estudiados y se observó que ésta fue diferente según el producto. En las muestras de pechuga de pavo la variación del pH fue significativa con respecto al tiempo de análisis ($p < 0.05$), mientras que no lo fue con respecto a la temperatura ($p > 0.05$). El valor inicial de pH fue de 6.22, a partir del 8º día de análisis los valores se estabilizaron, y finalmente se alcanzaron unos valores de pH entre 5.99 y 6.06. La evolución del pH en las muestras de pechuga de pollo y de jamón cocido fue significativa con respecto al tiempo de análisis ($p < 0.05$) y respecto a la temperatura ($p < 0.05$), salvo a 10°C, donde no se observaron diferencias. El pH inicial fue similar en ambos productos, con valores de pH= 6.31 y 6.32 respectivamente y observándose un mayor descenso en sus niveles conforme aumentó la temperatura a lo largo del tiempo de análisis. La diferencia entre los dos productos cárnicos fue el pH final, que varió entre 5.18- 5.39 en el pollo cocido y entre 4.85- 5.25 en el jamón. En cualquiera de los productos, pechuga de pavo, pechuga de pollo y jamón cocido, se observó que el pH no varió de forma sustancial y no influyó en el crecimiento de las BAL alterantes.

5.3.2.2. Representación gráfica

La comparación gráfica se utilizó para determinar la fiabilidad de los modelos en la estimación del crecimiento observado de BAL en los productos cárnicos estudiados. Los pares de datos observados y predictivos para la *fase de adaptación* mediante los modelos de RS y RN (Tabla 38), se representaron directamente y con transformaciones de raíz cuadrada y logarítmica (Figuras 29 (a), (b), (c) respectivamente).

Como se observa, la representación logarítmica es la que mostró los datos más agrupados y distribuidos más homogéneamente a lo largo de la línea de equivalencia (Figura 29 (c)). En esta figura podemos observar como las estimaciones obtenidas con los modelos de RN son las que se asemejan más a los valores observados en los productos cárnicos cocidos, lo cual queda reflejado en su distribución más cercana a la línea de concordancia perfecta.

En algunos estudios científicos, también se observaron aceptables coincidencias entre los valores predictivos y los observados en diversos alimentos para λ o el tiempo de generación, para microorganismos alterantes (Dalgaard, 1995; Pin y col., 1999; Devlieghere y col., 2000).

Como se puede observar en las Figuras 29, existen algunos datos que se alejan de la línea de equivalencia. Por tanto, se mostró falta de coincidencia entre valores predictivos y observados para λ , que puede ser debida principalmente al estado fisiológico del inóculo y otros factores (errores experimentales, falta de precisión del modelo, etc.) según fue descrito por Robinson y col. (1998) y de Giffel y Zwietering (1999).

En las Figuras 30 (a), (b), (c) se representaron los pares de valores observados y predictivos por los diferentes modelos en anaerobiosis (Tabla 39) para el parámetro ***tasa máxima de crecimiento***. En cualquiera de estas figuras podemos observar que las estimaciones realizadas por los modelos de RN aparecieron agrupadas, si bien la mayoría de ellas estuvieron por debajo de la línea de equivalencia. En cuanto a los modelos de RS, se observó como sus predicciones fueron adecuadas, ya que se situaron en el lado de sobrestimación, lo que supone que estos modelos predicen una velocidad de crecimiento de BAL mayor que la observada en el alimento.

En otros estudios se han observado adecuadas coincidencias entre los valores predictivos y los observados en alimentos para μ_{max} , tanto para microorganismos patógenos (Ross, 1996; Sutherland y col., 1996; Dalgaard y Jørgensen, 1998) como alterantes (Dalgaard, 1995; Pin y col., 1999; Devlieghere y col., 2000).

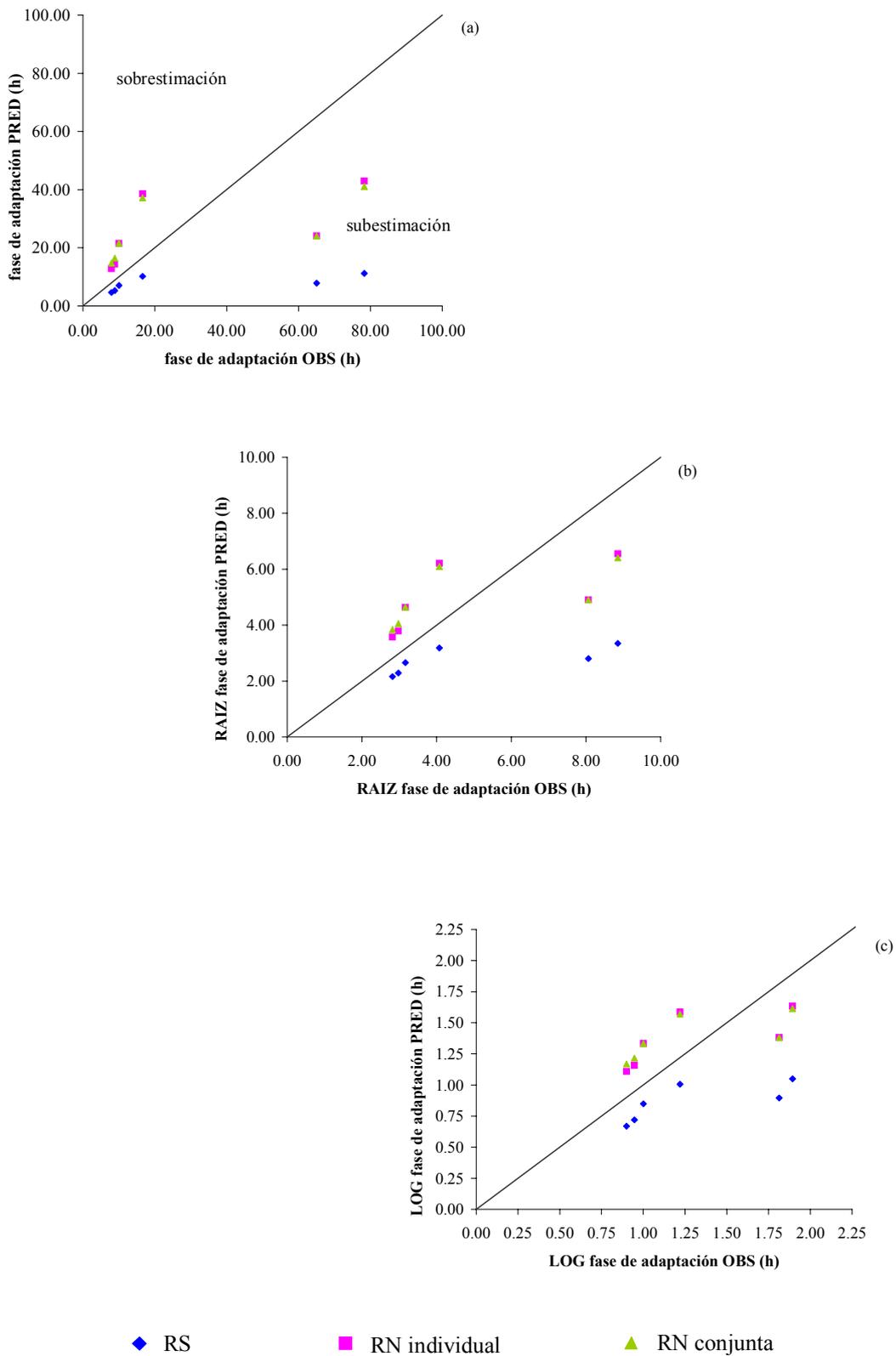


Figura 29. Representación gráfica de la fase de adaptación (h) de las bacterias ácido lácticas observada en productos cárnicos cocidos por los modelos matemáticos en escala lineal (a), transformada a raíz cuadrada (b) y transformada a logaritmo decimal (c) en anaerobiosis.

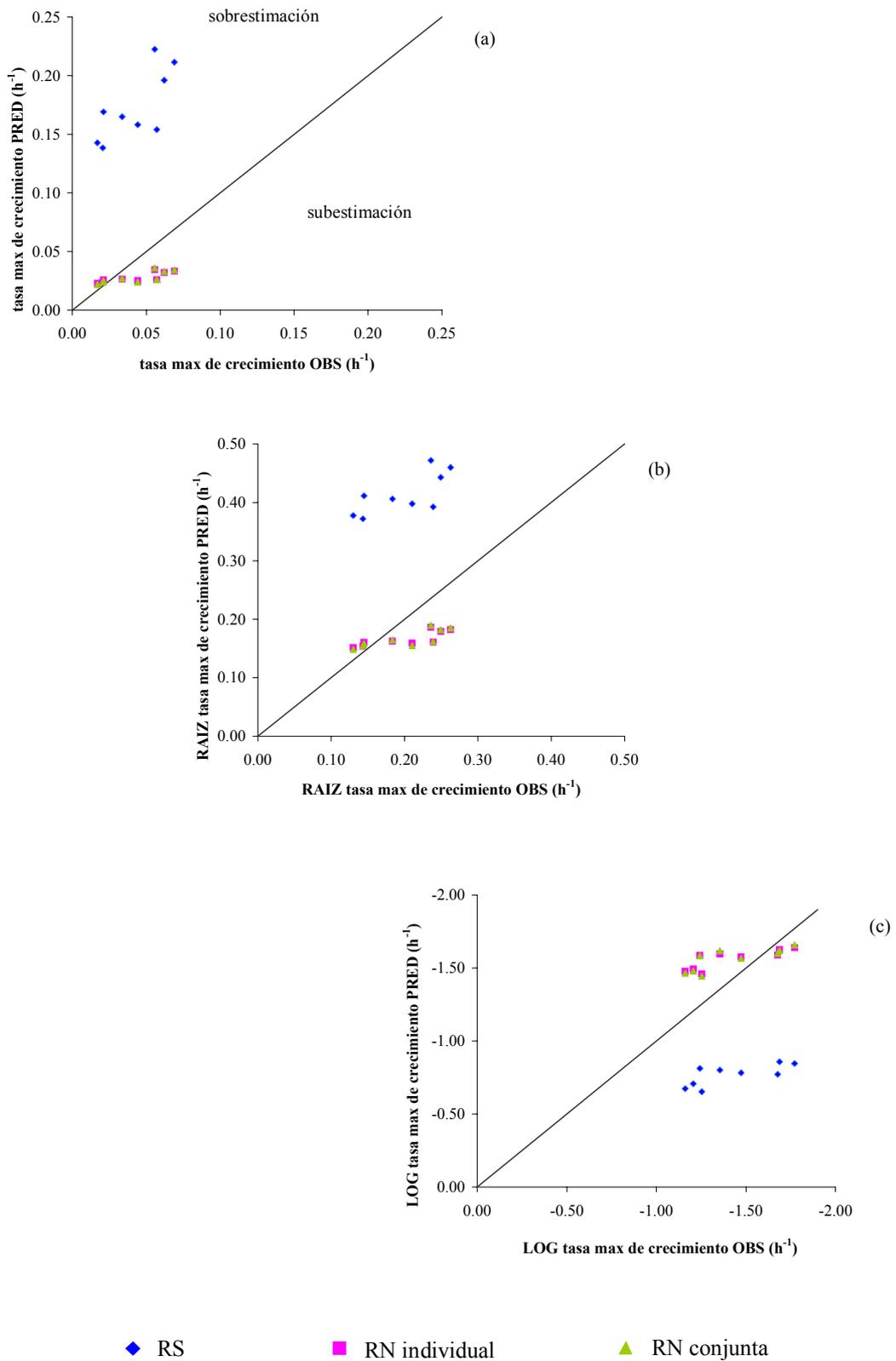


Figura 30. Representación gráfica de la tasa máxima específica de crecimiento (h^{-1}) de las bacterias ácido lácticas observada en productos cárnicos cocidos y predictiva por los modelos matemáticos en escala lineal (a), transformada a raíz cuadrada (b) y transformada a logaritmo decimal (c) en anaerobiosis..

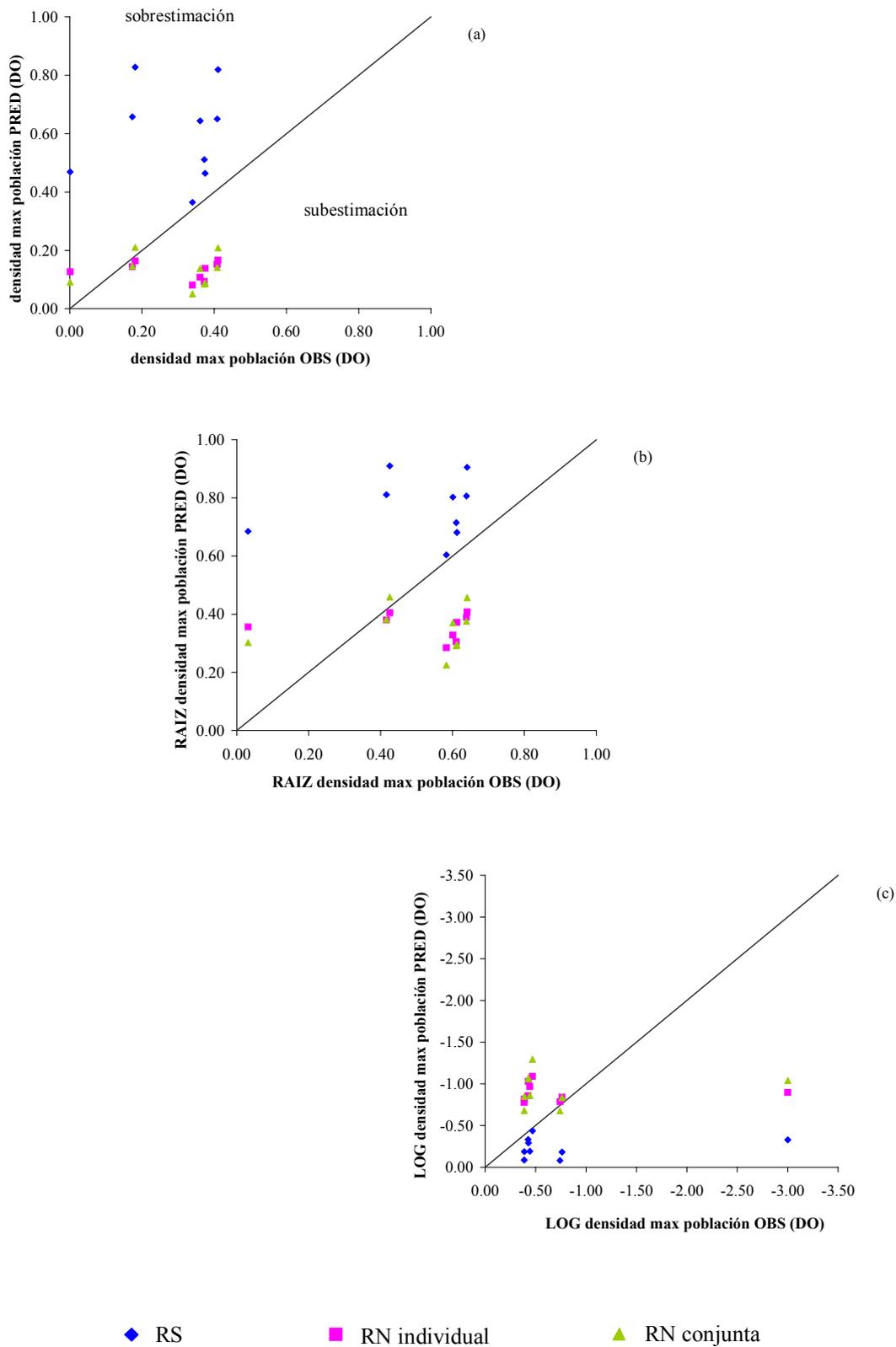


Figura 31. Representación gráfica de la densidad máxima de población (DO) de las bacterias ácido lácticas observada en productos cárnicos cocidos y predictiva por los modelos matemáticos en escala lineal (a), transformada a raíz cuadrada (b) y transformada a logaritmo decimal (c) en anaerobiosis.

Para calcular el valor estimado del parámetro **densidad máxima de población** mediante los modelos predictivos, previamente fue necesario transformar los valores observados del recuento de BAL, para los productos cárnicos, en valores de absorbancia mediante la recta de calibrado elaborada, y descrita en la sección 5.2. Gracias a esta recta, obtuvimos los valores de y_{End} observados en los productos cárnicos cocidos expresados en densidad óptica, con los cuales se realizó la validación.

Los valores observados de y_{End} en los productos cárnicos, una vez transformados en valores de absorbancia, y los predictivos por los modelos (Tabla 40), han sido representados de forma lineal y mediante transformaciones de raíz cuadrada y logaritmo decimal (Figuras 31 (a), (b), (c) respectivamente).

Podemos observar como los modelos de RN predicen el parámetro y_{End} con más exactitud que el modelo de RS, si bien los valores observados son mayores que los estimados por RN (puntos por debajo de la línea de equivalencia). De este modo, para un determinado momento en el tiempo, los niveles observados de y_{End} serían más elevados que los estimados, desencadenando en la aparición de signos de alteración relacionados un cierto recuento microbiano. Todo ello muestra como este parámetro cinético presenta importantes dificultades para ser modelado, cuestión por la que quizás no existen apenas modelos matemáticos recogidos en las referencias bibliográficas.

5.3.2.3. *Indices matemáticos y estadísticos*

Además de la comparación gráfica, otro método empleado para validar los modelos predictivos en los productos cárnicos es el cálculo de los índices matemáticos $RMSE$, B_f y A_f , que proporcionan un objetivo resumen de la fiabilidad de los modelos en microbiología predictiva (Ross, 1996).

Como podemos observar en la Tabla 38, no se observó **fase de adaptación** en las muestras de pechuga de pollo. Para la pechuga de pavo los valores observados fueron, en general superiores a los estimados por los modelos, mientras que para el jamón cocido, los valores observados de λ fueron superiores a los valores estimados solamente en el caso del modelo de RS.

Tabla 38. Evaluación de la fase de adaptación observada (λ_{OBS}) en productos cárnicos cocidos y predictiva obtenida por los diferentes modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en anaerobiosis para las bacterias ácido lácticas.

Producto	T (°C)	λ	λ	λ	λ
		OBS (h)	RS	RN individual	RN conjunto
Pechuga de pollo	10.5	*	*	*	*
	13.5	*	*	*	*
	17.7	*	*	*	*
Pechuga de pavo	10.5	78.31	11.20	42.93	41.10
	13.5	65.06	7.85	24.08	24.03
	17.7	8.85	5.24	14.39	16.44
Jamón	10.5	16.60	10.15	38.57	37.19
	13.5	10.00	7.06	21.52	21.58
	17.7	7.94	4.66	12.82	14.75
		RMSE	1.237	0.720	0.755
		B_f	0.69	1.09	1.11
		A_f	1.45	1.26	1.28

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

*: no se detectó

Los índices matemáticos calculados para este parámetro cinético mostraron reducidos valores para el estadístico *RMSE* (Tabla 38), con valores entre 0.720 y 1.237. Para el índice *B_f*, se observa que los modelos de RN individual y conjunto son los que mejor predicen la fase de adaptación de las BAL, ya que *B_f* = 1.09 y 1.11 respectivamente. En la Tabla 38 también aparecen los valores del índice *A_f* y, como ocurrió para el factor *B_f*, los modelos de RN son los que muestran los valores más próximos a la unidad (*A_f* = 1.26-1.28), aunque se sobrestima este parámetro en un 26 y 28% en relación con las observaciones experimentales.

Para el parámetro *tasa máxima de crecimiento* se compararon los valores observados en los tres productos cárnicos con las predicciones proporcionadas por los modelos de RS y RN (Tabla 39). Los valores estimados por el modelo de RS para μ_{max}

fueron mucho más elevados que los observados en los tres productos cárnicos, mientras que los modelos de RN mostraron valores más aproximados a los experimentales.

En la Tabla 39 se puede observar que los valores del estadístico *RMSE* son reducidos, indicando pequeñas desviaciones entre los datos experimentales y predictivos. Los modelos de RN individual y conjunto fueron los que describieron el menor valor para este índice, *RMSE*= 0.021, seguido por el modelo de RS, con un valor de 0.132.

Tabla 39. Evaluación de la tasa máxima específica de crecimiento observada (μ_{OBS}) en productos cárnicos cocidos y predictiva obtenida por los diferentes modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en anaerobiosis para las bacterias ácido lácticas.

<i>Producto</i>	<i>T</i> (°C)	μ	μ	μ	μ
		<i>OBS</i> (h^{-1})	<i>RS</i>	<i>RN individual</i>	<i>RN conjunto</i>
<i>Pechuga de pollo</i>	10.5	0.044	0.158	0.025	0.024
	13.5	0.057	0.154	0.026	0.026
	17.7	0.069	0.212	0.033	0.034
<i>Pechuga de pavo</i>	10.5	0.017	0.143	0.023	0.022
	13.5	0.021	0.138	0.024	0.024
	17.7	0.062	0.196	0.032	0.033
<i>Jamón</i>	10.5	0.021	0.169	0.026	0.025
	13.5	0.034	0.165	0.026	0.027
	17.7	0.056	0.223	0.035	0.036
<i>RMSE</i>			0.132	0.021	0.021
<i>B_f</i>			4.55	0.73	0.73
<i>A_f</i>			4.55	1.58	1.55

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

El índice sesgo, *B_f*, fue calculado para todos los parámetros (Tabla 39), mostrando los valores más ajustados al aplicar los modelos de RN (*B_f*= 0.73). Sin embargo, el que este factor sea inferior a 1, es signo de subestimación de la tasa de crecimiento de *L. mesenteroides* en los productos cárnicos, desde el punto de vista comercial y sensorial.

En cuanto al índice exactitud, A_f , se comprueba que el modelo de RN conjunto estimó el parámetro μ_{max} con mayor exactitud, con un valor de 1.55, lo que indica que las predicciones exceden un 55% de las observaciones experimentales (Tabla 39).

Existen en la literatura varios trabajos científicos en donde diversos modelos matemáticos fueron validados en alimentos naturalmente contaminados. En general, los índices en estos estudios fueron más ajustados que los obtenidos en nuestro trabajo. Devlieghere y col. (2000) obtuvieron un elevado ajuste para la tasa máxima de crecimiento, entre los valores observados en productos cárnicos cocidos con su carga microbiana natural (entre ellos, BAL) y los estimados, mediante el modelo extendido de Ratkowsky y el modelo de Respuesta en Superficie ($B_f= 0.95$ y $A_f= 1.32$ y $B_f= 0.98$ y $A_f= 1.20$, respectivamente).

Para el parámetro tiempo de generación (inversa de la tasa máxima de crecimiento), se ha realizado la validación de los modelos elaborados para *Pseudomonas sp.* en carne naturalmente contaminada, obteniendo valores para el B_f entre 0.97 y 1.49 y A_f entre 1.09 y 1.49 (Lebert y col., 2000).

Otros autores observaron valores muy ajustados del B_f entre 0.75- 1.25 para el parámetro tasa máxima de crecimiento de los microorganismos alterantes *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreim* en productos de la pesca (Dalgaard, 1995).

Para el parámetro cinético **densidad máxima de población** (y *End*), en la Tabla 40 se muestran los valores observados en los tres productos cárnicos y los predictivos por los modelos matemáticos. Para el pollo y el jamón, la mayor similitud se observa entre los valores experimentales y los estimados por el modelo de RS, mientras que para el pavo cocido, los modelos de RN son los que estiman valores más aproximados a los observados.

Los resultados obtenidos para el estadístico *RMSE* (Tabla 40), muestran los valores más reducidos, alrededor de 1.850, para los modelos de RN. Para los índices B_f y A_f se observa que los modelos de RN individual y conjunto, son los que mejor ajustan el parámetro *yEnd*, ya que presentan valores más cercanos a 1 ($B_f= 1.49$ y 1.52; $A_f= 1.95$ y 1.97). No obstante, el modelo de RS presenta un importante factor de diferencia,

cercano a 3, entre las observaciones y las predicciones, mostrándose por tanto una escasa exactitud en las estimaciones.

Hay que tener en cuenta que las transformaciones de los valores de recuento a valores de absorbancia pueden influir en las diferencias existentes entre los valores observados y los predictivos.

Tabla 40. Evaluación de la densidad máxima de población observada ($yEnd_{OBS}$) en productos cárnicos y predictiva obtenida por los diferentes modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en anaerobiosis para las bacterias ácido lácticas.

<i>Producto</i>	<i>T (°C)</i>	<i>yEnd</i>	<i>yEnd</i>	<i>yEnd</i>	<i>yEnd</i>
		<i>OBS (DO)</i>	<i>RS</i>	<i>RN individual</i>	<i>RN conjunto</i>
<i>Pechuga de pollo</i>	10.5	0.340	0.365	0.081	0.051
	17.5	0.372	0.511	0.094	0.085
	24.5	0.361	0.644	0.108	0.137
<i>Pechuga de pavo</i>	10.5	0.001	0.469	0.127	0.091
	17.5	0.173	0.657	0.144	0.146
	24.5	0.181	0.828	0.164	0.210
<i>Jamón</i>	10.5	0.375	0.464	0.138	0.087
	17.5	0.408	0.650	0.152	0.141
	24.5	0.410	0.819	0.166	0.209
<i>RMSE</i>			2.188	1.877	1.852
<i>B_f</i>			0.34	1.49	1.52
<i>A_f</i>			2.91	1.95	1.97

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

DO: unidades de densidad óptica

Como resumen de la **validación realizada en productos cárnicos cocidos**, seleccionamos los modelos de RN, tanto individual como conjunto, como los que mejor estimaron los parámetros λ , μ_{max} e $yEnd$, ya que presentaron reducidos errores de estimación *RMSE* y valores aproximados a 1 para los índices *B_f* y *A_f* (Tablas 38, 39 y 46), si bien el modelo de RN individual describió valores algo más ajustados.

5.3.3. Validación en jugo de productos cárnicos

Para validar los modelos predictivos de *L. mesenteroides* se ha estudiado el crecimiento de este microorganismo inoculado en el jugo de productos cárnicos cocidos, siendo ésta una situación intermedia entre el crecimiento en caldo de cultivo y crecimiento en el alimento.

5.3.3.1. Representación gráfica

La comparación gráfica es el primer método utilizado para evaluar la fiabilidad de los modelos elaborados, que estiman el comportamiento de *L. mesenteroides* en el jugo de productos cárnicos cocidos. Para la *fase de adaptación*, los pares de valores observados y predictivos por los diferentes modelos en aerobiosis y anaerobiosis (Tabla 41 y 44), han sido representados directamente y mediante transformaciones de raíz cuadrada y logaritmo decimal, los cuales se muestran en las Figuras 32 (a), (b), (c) respectivamente.

Como se puede observar, la representación logarítmica es la que presenta los datos menos dispersos y más homogéneamente distribuidos (Figura 32 (c)). En esta figura podemos observar que las predicciones obtenidas con el modelo de RS se acercan más a los valores observados en el jugo de los productos cárnicos cocidos, lo cual queda reflejado en su distribución más cercana a la línea de concordancia perfecta.

Según lo observado en las Figuras, el modelo de RN individual es el que realiza las predicciones más alejadas de λ con respecto a las observadas en el jugo cárnico. La falta de coincidencia entre valores predictivos y observados para este parámetro puede ser debida al estado fisiológico del inóculo, errores experimentales, falta de precisión del modelo, factores no recogidos por el modelo que influyen en el crecimiento (conservantes, envasado en atmósfera modificada, microorganismos competitivos) o condiciones cercanas a los límites de crecimiento (te Giffel y Zwietering, 1999).

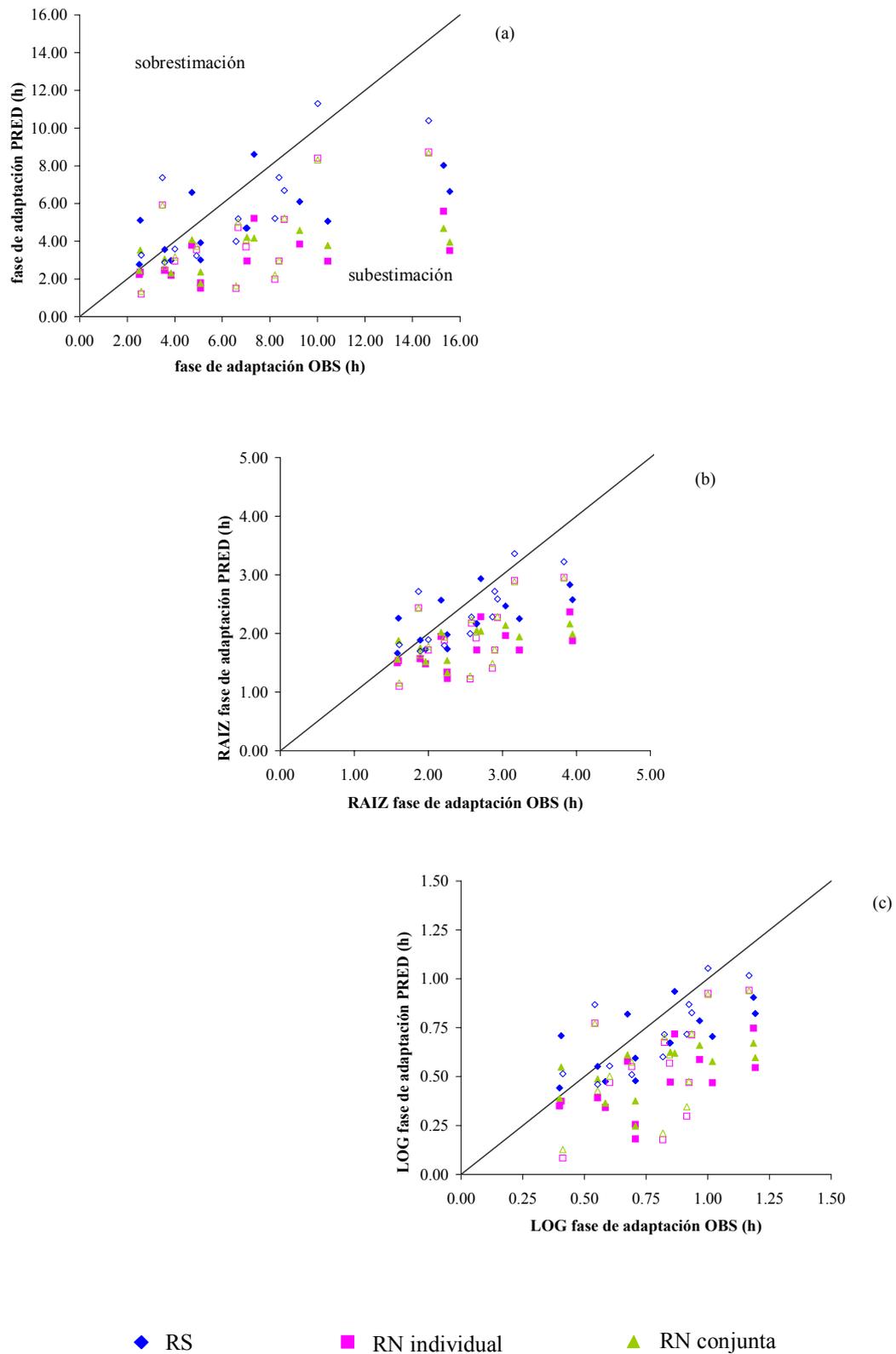


Figura 32. Representación gráfica de la fase de adaptación (h) de *L. mesenteroides* observada en jugo cárnico y predictiva por los modelos matemáticos en escala lineal (a), transformada a raíz cuadrada (b) y transformada a logaritmo decimal (c). Puntos con relleno: aerobiosis. Puntos vacíos: anaerobiosis.

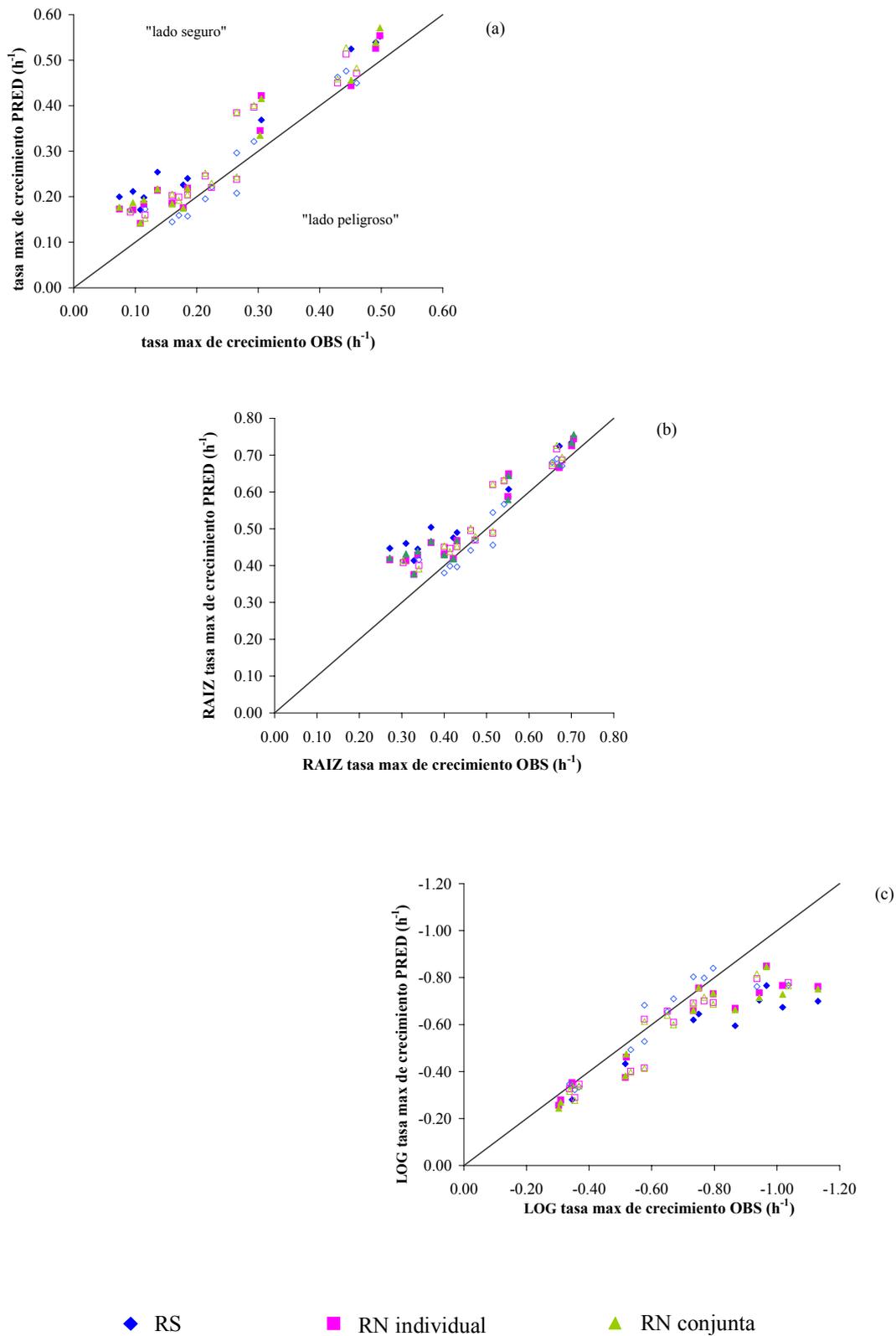


Figura 33. Representación gráfica de la tasa máxima específica de crecimiento (h^{-1}) de *L. mesenteroides* observada en jugo cárnico y predictiva por los modelos matemáticos en escala lineal (a), transformada a raíz cuadrada (b) y transformada a logaritmo decimal (c). Puntos con relleno: aerobiosis. Puntos vacíos: anaerobiosis.

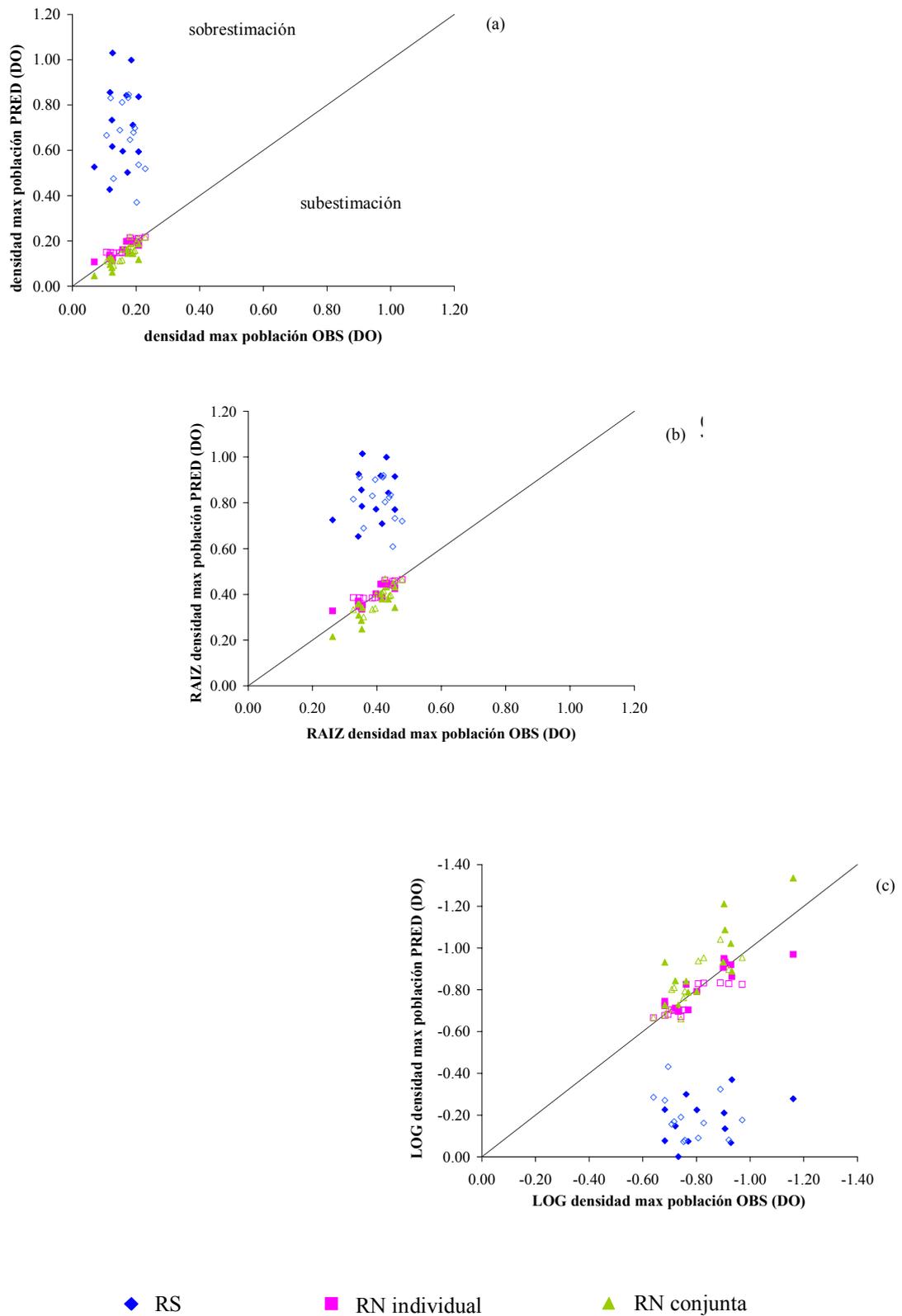


Figura 34. Representación gráfica de la densidad máxima de población (DO) de *L. mesenteroides* observada en jugo cárnico y predictiva por los modelos matemáticos en escala lineal (a), transformada a raíz cuadrada (b) y transformada a logaritmo decimal (c). Puntos con relleno: aerobiosis. Puntos vacíos: anaerobiosis.

En la Figura 32 (a), para λ se observa como, en general, los valores observados en el jugo son mayores que los estimados por los modelos matemáticos. Este resultado es de esperar, ya que los modelos predictivos se han elaborado en medio de cultivo líquido rico en nutrientes, por lo que la fase de adaptación de *L. mesenteroides* es menor, mientras que en los productos cárnicos pueden existir una serie de factores, tales como la presencia de microorganismos competitivos, sustancias antimicrobianas, conservantes, etc., que pueden influir aumentando la fase de adaptación del microorganismo (te Giffel y Zwietering, 1999; Dalgaard y Jørgensen, 1998).

En las Figuras 33 (a), (b), (c) aparecen representados los pares de valores observados y predictivos por los diferentes modelos en aerobiosis y anaerobiosis (Tabla 42 y 45) para el parámetro *tasa máxima de crecimiento*.

En este caso, la transformación de raíz cuadrada es la que muestra los datos menos dispersos (Figura 33 (b)). A su vez, observamos como el modelo de RN individual estima con gran exactitud la μ_{max} con respecto a los valores observados en el jugo cárnico, mostrando los pares de datos una distribución cercana a la línea de equivalencia.

Otros estudios han mostrado adecuadas coincidencias para μ_{max} entre los valores predictivos y los observados en alimentos inoculados con microorganismos patógenos (Ross, 1996; Sutherland y col., 1996; Dalgaard y Jørgensen, 1998) o alterantes (Dalgaard, 1995; Pin y col., 1999; Devlieghere y col., 2000).

Al igual que ocurrió para la fase de adaptación, la mayoría de las estimaciones realizadas por los modelos se sitúan por encima de la línea de equivalencia, Figura 33 (a), lo que supone que estos modelos predicen una velocidad de crecimiento de *L. mesenteroides* mayor que la observada en el jugo cárnico.

Los valores observados en el jugo y los predictivos por los modelos para el parámetro *densidad máxima de población* (Tabla 43 y 46), han sido representados de forma lineal y mediante transformaciones de raíz cuadrada y logaritmo decimal (Figuras 34 (a), (b), (c) respectivamente).

Podemos observar como el modelo de RN individual predice con gran exactitud el parámetro y_{End} tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, situándose los puntos muy cercanos a la línea de equivalencia. Sin embargo, se comprueba como los valores estimados mediante RS se sitúan muy alejados, siendo signo de la falta de ajuste entre éstos y los observados experimentalmente. En las Figuras 34 observamos como para el modelo de RN conjunto los valores observados son mayores que los estimados (puntos por debajo de la línea de equivalencia). De este modo, para un determinado momento en el tiempo, los niveles observados de y_{End} serían más elevados que los estimados, desencadenando en la aparición de signos de alteración relacionados un cierto recuento microbiano. Todo ello muestra como este parámetro cinético presenta importantes dificultades para ser modelado, cuestión por la que quizás no existen apenas modelos matemáticos recogidos en las referencias bibliográficas.

5.3.3.2. *Indices matemáticos y estadísticos*

Para realizar la comparación matemática se han enfrentado los valores observados para cada uno de los parámetros de crecimiento, descritos por *L. mesenteroides* en los jugos cárnicos, con las estimaciones proporcionadas por los modelos de RS y RN en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

Aerobiosis

La predicción de la duración de la *fase de adaptación* en sí misma posee más dificultades que la velocidad de crecimiento, puesto que depende del estado fisiológico y tamaño del inóculo y de las condiciones previas de crecimiento (Robinson y col., 1998; Ross y col., 2000a). Por ello las predicciones de este parámetro de crecimiento deben ser interpretadas con prudencia. Como se muestra en la Tabla 41, los valores observados en el jugo de los tres productos cárnicos para la fase de adaptación son, en general, superiores a los valores estimados por los modelos predictivos. Este fenómeno es de esperar, puesto los modelos matemáticos se han elaborado en medios de cultivo líquidos ricos en nutrientes, lo que proporciona condiciones favorables para el crecimiento del microorganismo (te Giffel y Zwietering, 1999).

Tabla 41. Evaluación de la fase de adaptación observada (λ_{OBS}) en jugo de productos cárnicos y predictiva obtenida por los diferentes modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en aerobiosis para *L. mesenteroides*.

Jugo	T (°C)	λ	λ	λ	λ
		<i>OBS (h)</i>	<i>RS</i>	<i>RN individual</i>	<i>RN conjunto</i>
<i>Pechuga de pollo</i>	10.5	7.338	8.610	5.218	4.170
	14	4.720	6.594	3.789	4.076
	17.5	10.434	5.065	2.943	3.782
	24.5	3.843	2.984	2.197	2.313
<i>Pechuga de pavo</i>	14	15.575	6.638	3.514	3.950
	17.5	2.546	5.112	2.361	3.531
	21	5.084	3.923	1.802	2.372
	24.5	5.089	3.011	1.519	1.765
<i>Jamón</i>	10.5	15.310	8.020	5.590	4.680
	14	9.259	6.097	3.857	4.571
	17.5	7.038	4.697	2.960	4.213
	21	3.575	3.559	2.459	3.072
	24.5	2.507	2.767	2.242	2.449
		RMSE	0.537	0.942	0.850
		B_f	1.00	0.53	0.63
		A_f	1.33	1.97	1.76

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

Los resultados obtenidos para el estadístico *RMSE*, B_f (Tabla 41) indican que la menor desviación, y por tanto el mejor ajuste entre las observaciones y las estimaciones, se produce mediante el modelo de RS, con valores de 0.537 y 1.00. Para el resto de modelos, RN individual y conjunto, el B_f presenta valores de 0.53 y 0.63 respectivamente, de forma que subestiman la fase de adaptación de este microorganismo con respecto a las observaciones experimentales. En la Tabla 41 se muestran los diferentes valores del índice A_f calculados a partir de los diferentes modelos predictivos en atmósfera aeróbica. La mayor exactitud en las predicciones se produce en el modelo de RS, ya que se observa el A_f más reducido y cercano a la unidad, con un valor de 1.33. El resto de modelos matemáticos presentan unos valores algo más elevados, $A_f = 1.97$ y 1.76 para los modelos de RN individual y conjunto respectivamente, lo cual nos indica

que existe un factor de diferencia próximo a 2 entre las observaciones y las predicciones, traduciéndose en una menor exactitud en las estimaciones, que también fue descrito en algunos estudios científicos (Barco, 2001; Castillejo, 2002).

Para el parámetro *tasa máxima de crecimiento* se han comparado los valores observados por *L. mesenteroides* en el jugo de los tres productos cárnicos con las estimaciones proporcionadas por los modelos de RS y RN en aerobiosis. Como se puede observar en la Tabla 42, los valores observados para la μ_{max} en el jugo cárnico son, en prácticamente todos los casos, algo inferiores a los valores predictivos obtenidos con los tres tipos de modelos matemáticos, lo que se traduce en la obtención de predicciones adecuadas del crecimiento de *L. mesenteroides* desde el punto de vista comercial. Este hecho se considera lógico si tenemos en cuenta que los modelos matemáticos han sido elaborados a partir de datos de crecimiento de este microorganismo en caldo de cultivo líquido, el cual posee todos los nutrientes necesarios para su óptimo desarrollo (te Giffel y Zwietering, 1999).

En general, para todas las temperaturas de almacenamiento se observan coincidencias entre los valores observados y los predictivos mediante los diferentes modelos, si bien, se muestran mayores diferencias a la temperatura más baja, 10.5°C, debido posiblemente a la inherente gran variabilidad en la respuesta microbiana a condiciones menos favorables para el crecimiento (Ross, 1996).

Los cálculos para el estadístico *RMSE* muestran valores muy reducidos (Tabla 42), siendo inferiores a 0.082 para todos los modelos predictivos, debido a las menores desviaciones encontradas entre los datos experimentales y los estimados. El modelo de RN individual es el modelo matemático que describe el menor valor para este índice, *RMSE*= 0.072, aunque para el resto de modelos se observan unos valores muy similares.

Tabla 42. Evaluación de la tasa máxima específica de crecimiento observada (μ_{OBS}) en jugo de productos cárnicos y predictiva obtenida por los diferentes modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en aerobiosis para *L. mesenteroides*.

<i>Jugo</i>	<i>T</i> (°C)	μ_{max}	μ_{max}	μ_{max}	μ_{max}
		<i>OBS</i> (h^{-1})	<i>RS</i>	<i>RN individual</i>	<i>RN conjunto</i>
<i>Pechuga de pollo</i>	10.5	0.114	0.198	0.184	0.193
	14	0.160	0.186	0.186	0.184
	17.5	0.185	0.24	0.219	0.219
	24.5	0.491	0.539	0.526	0.539
<i>Pechuga de pavo</i>	14	0.108	0.171	0.141	0.143
	17.5	0.178	0.226	0.176	0.175
	21	0.303	0.344	0.345	0.335
	24.5	0.451	0.524	0.444	0.456
<i>Jamón</i>	10.5	0.096	0.212	0.171	0.187
	14	0.074	0.200	0.173	0.177
	17.5	0.136	0.254	0.214	0.217
	21	0.305	0.369	0.422	0.415
	24.5	0.498	0.552	0.554	0.571
		RMSE	0.082	0.072	0.076
		B_f	1.47	1.34	1.37
		A_f	1.47	1.34	1.37

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

El índice sesgo, B_f , también ha sido calculado para todos los modelos predictivos elaborados. Se puede observar en la Tabla 42 como, en todos los casos, $B_f > 1$, lo cual nos indica que todos los modelos realizan predicciones adecuadas desde el punto de vista comercial y sensorial de la tasa de crecimiento de *L. mesenteroides* en los productos cárnicos. Es importante que el modelo predictivo no sobrestime en exceso los valores de crecimiento, ya que en ese caso, se podrían producir pérdidas económicas para los productores, al estimar mayores velocidades de crecimiento, y por tanto, de alteración sensorial. El modelo que presenta un mayor ajuste es el de RN individual, con un valor de 1.34, lo que indica que las predicciones exceden en un 34% de las observaciones experimentales, dentro de lo aceptable según Ross y col. (2000a), que

describen B_f entre 1.4- 1.6 para cuatro factores ambientales, como es nuestro caso (T, pH, NaCl y NaNO₂).

Como se puede observar en la Tabla 42, el índice A_f presenta los mismos valores que B_f , variando en un rango entre 1.34 y 1.47 según el modelo predictivo. La mayor exactitud en la estimación de la tasa máxima de crecimiento de *L. mesenteroides* se observa con el modelo de RN individual que con el resto de modelos, ya que presenta un valor de 1.34, más próximo a la unidad.

Tabla 43. Evaluación de la densidad máxima de población observada ($y_{End_{OBS}}$) en jugo de productos cárnicos y predictiva obtenida por los diferentes modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en aerobiosis para *L. mesenteroides*.

Jugo	T (°C)	y_{End}	y_{End}	y_{End}	y_{End}
		<i>OBS (DO)</i>	<i>RS</i>	<i>RN individual</i>	<i>RN conjunto</i>
Pechuga de pollo	10.5	0.117	0.427	0.137	0.129
	14	0.173	0.502	0.149	0.144
	17.5	0.158	0.596	0.161	0.161
	24.5	0.208	0.837	0.180	0.187
Pechuga de pavo	14	0.208	0.594	0.189	0.117
	17.5	0.190	0.711	0.194	0.144
	21	0.170	0.843	0.198	0.163
	24.5	0.185	0.998	0.201	0.187
Jamón	10.5	0.069	0.526	0.107	0.046
	14	0.125	0.617	0.112	0.061
	17.5	0.124	0.734	0.117	0.082
	21	0.118	0.856	0.120	0.095
	24.5	0.126	1.030	0.124	0.117
		RMSE	1.503	0.304	0.299
		B_f	0.13	0.95	0.95
		A_f	7.82	1.13	1.13

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

DO: unidades de densidad óptica

El parámetro cinético *densidad máxima de población* no ha sido frecuentemente modelado en la microbiología predictiva.

En la Tabla 43 se presentan los valores observados en los jugos cárnicos y los predictivos por los modelos matemáticos para este parámetro.

Como se puede observar, existen importantes diferencias entre los valores experimentales y los estimados por el modelo de RS, mientras que para el resto de modelos la coincidencia es mayor. Este hecho se comprueba también con los resultados obtenidos para el estadístico *RMSE* (Tabla 43), que muestran un valor elevado de 1.503 para el modelo de RS y valores reducidos, alrededor de 0.300, para los modelos de RN individual y conjunto. Con respecto al índice B_f , se observa que los dos modelos anteriormente citados, son los que mejor ajustan el parámetro *y End*, ya que presentan valores próximos a la unidad ($B_f = 0.95$), si bien subestiman la respuesta de este microorganismo con respecto a la densidad máxima de población alcanzada en las observaciones experimentales.

En la Tabla 43 se muestran los diferentes valores del índice A_f calculados a partir de los diferentes modelos predictivos en atmósfera aeróbica. Coincidiendo con el resto de los índices reseñados con anterioridad (*RMSE* y B_f), la mayor exactitud en las predicciones se produce en los modelos de RN individual y conjunto, ya que se observa el A_f más cercano a la unidad, con un valor de 1.13. Sin embargo, el modelo de RS presenta un importante factor de diferencia, superior a 7, entre las observaciones y las predicciones, indicándonos por tanto una escasa exactitud en las estimaciones.

Como resumen de la **validación en jugo de productos cárnicos cocidos en aerobiosis**, seleccionamos el modelo de RS, para λ , y los modelos de RN individual o conjunto, para μ_{max} e *yEnd*, como los modelos que mejor estimaron dichos parámetros, describiendo reducidos valores del estadístico *RMSE* y valores aproximados a 1 para los índices B_f y A_f (Tablas 41, 42 y 43).

Anaerobiosis

Para la *fase de adaptación* en atmósfera anaeróbica, al igual que ocurría en aerobiosis, los valores observados en los jugos cárnicos son superiores a los valores estimados por los modelos matemáticos.

Tabla 44. Evaluación de la fase de adaptación observada (λ_{OBS}) en jugo de productos cárnicos y predictiva obtenida por los diferentes modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en anaerobiosis para *L. mesenteroides*.

Jugo	T (°C)	λ	λ	λ	λ
		OBS (h)	RS	RN individual	RN conjunto
<i>Pechuga de pollo</i>	10.5	10.018	11.299	8.408	8.316
	14	3.480	7.373	5.925	5.915
	17.5	6.670	5.190	4.729	5.015
	24.5	4.915	3.234	3.555	3.746
<i>Pechuga de pavo</i>	14	8.385	7.384	2.946	2.987
	17.5	8.215	5.207	1.985	2.219
	21	6.575	3.991	1.503	1.628
	24.5	2.585	3.266	1.211	1.339
<i>Jamón</i>	10.5	14.680	10.391	8.730	8.678
	14	8.610	6.695	5.161	5.239
	17.5	7.000	4.691	3.703	4.084
	21	4.000	3.585	2.948	3.174
	24.5	3.575	2.885	2.468	2.676
		RMSE	0.424	1.018	0.944
		B_f	1.00	0.39	0.47
		A_f	1.30	2.68	2.27

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

Los índices matemáticos obtenidos para este parámetro de crecimiento en anaerobiosis son muy similares a los resultantes en aerobiosis. De este modo, el estadístico *RMSE* (Tabla 44) indica que el modelo de RS es el que presenta el mejor ajuste entre los valores observados y estimados, con un valor de 0.424. Para el índice *B_f*, se observa que el modelo de RS es también el que mejor estima la fase de adaptación de

L. mesenteroides, ya que $B_f = 1.00$. Para el resto de modelos, RN individual y conjunto, el B_f presenta valores de 0.39 y 0.47 respectivamente, de forma que subestiman la fase de adaptación de este microorganismo con respecto a las observaciones experimentales. En la Tabla 44 se muestran los diferentes valores del índice A_f calculados a partir de los modelos predictivos, y observamos que el modelo de RS es el que presenta mayor exactitud entre las observaciones y predicciones, con un valor de 1.30. El resto de modelos muestran valores más elevados, $A_f > 2$, indicando una menor exactitud en las estimaciones.

Para el parámetro *tasa máxima de crecimiento* se han comparado los valores observados por *L. mesenteroides* en los jugos cárnicos con las estimaciones proporcionadas por los modelos de RS y RN en anaerobiosis (Tabla 45). En general, los valores para μ_{max} en el jugo de los productos cárnicos, son algo inferiores a los valores estimados por los modelos matemáticos, obteniéndose predicciones adecuadas del crecimiento de *L. mesenteroides* desde el punto de vista comercial. Este fenómeno es previsible, ya que los modelos matemáticos han sido elaborados a partir de datos de crecimiento de este microorganismo en caldo de cultivo líquido, el cual posee todos los nutrientes necesarios para su óptimo desarrollo (te Giffel y Zwietering, 1999).

En la Tabla 45 se puede observar que los valores del estadístico *RMSE* son muy reducidos, indicando pequeñas desviaciones entre los datos experimentales y predictivos. El modelo de RS es el que describe el menor valor para este índice, $RMSE = 0.039$, seguido por los modelos de RN individual y conjunto, con valores de 0.060 y 0.065 respectivamente.

El índice sesgo, B_f , calculado para todos los modelos predictivos (Tabla 45), muestra en todos los casos valores superiores a 1, signo de que todos los modelos realizan predicciones adecuadas, desde el punto de vista comercial y sensorial, de la tasa de crecimiento de *L. mesenteroides* en los jugos cárnicos. El modelo de RS es el que mejor estima el desarrollo de este microorganismo en anaerobiosis, con un valor $B_f = 1.05$, observando valores similares para el resto de modelos.

Tabla 45. Evaluación de la tasa máxima específica de crecimiento observada (μ_{OBS}) en jugo de productos cárnicos y predictiva obtenida por los diferentes modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en anaerobiosis para *L. mesenteroides*.

<i>Jugo</i>	<i>T</i> (°C)	μ_{max}	μ_{max}	μ_{max}	μ_{max}
		<i>OBS</i> (h ⁻¹)	<i>RS</i>	<i>RN individual</i>	<i>RN conjunto</i>
<i>Pechuga de pollo</i>	10.5	0.171	0.159	0.199	0.192
	14	0.185	0.157	0.203	0.205
	17.5	0.265	0.208	0.238	0.244
	24.5	0.429	0.463	0.450	0.459
<i>Pechuga de pavo</i>	14	0.160	0.145	0.203	0.206
	17.5	0.214	0.195	0.246	0.252
	21	0.265	0.296	0.384	0.386
	24.5	0.460	0.450	0.471	0.482
<i>Jamón</i>	10.5	0.116	0.173	0.160	0.153
	14	0.092	0.171	0.166	0.172
	17.5	0.224	0.221	0.220	0.230
	21	0.293	0.321	0.397	0.401
	24.5	0.443	0.476	0.513	0.527
		<i>RMSE</i>	0.039	0.060	0.065
		<i>B_f</i>	1.05	1.10	1.11
		<i>A_f</i>	1.17	1.21	1.23

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

En cuanto al índice exactitud, A_f , se comprueba que el modelo de RS es también el que predice con mayor exactitud el parámetro μ_{max} , con un valor de 1.17, lo que indica que las predicciones exceden un 17% de las observaciones experimentales (Tabla 45). Para el resto, el índice A_f presenta valores algo superiores, 1.21 y 1.23 para los modelos de RN individual y conjunto respectivamente.

Para el parámetro cinético *densidad máxima de población* (y *End*), en la Tabla 46 se muestran los valores observados en los jugos cárnicos y los predictivos por los modelos matemáticos. Como se puede observar, las diferencias entre los valores

experimentales y los estimados son superiores al emplear el modelo de RS, mientras que para el resto de modelos la coincidencia es mayor.

Tabla 46. Evaluación de la densidad máxima de población observada ($yEnd_{OBS}$) en jugo de productos cárnicos y predictiva obtenida por los diferentes modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en anaerobiosis para *L. mesenteroides*.

<i>Jugo</i>	<i>T</i> (°C)	<i>yEnd</i>	<i>yEnd</i>	<i>yEnd</i>	<i>yEnd</i>
		<i>OBS (DO)</i>	<i>RS</i>	<i>RN individual</i>	<i>RN conjunto</i>
<i>Pechuga de pollo</i>	10.5	0.202	0.370	0.208	0.198
	14	0.208	0.536	0.211	0.210
	17.5	0.181	0.646	0.213	0.219
	24.5	0.229	0.519	0.216	0.215
<i>Pechuga de pavo</i>	14	0.196	0.698	0.197	0.158
	17.5	0.177	0.846	0.198	0.173
	21	0.175	0.832	0.198	0.161
	24.5	0.192	0.678	0.199	0.155
<i>Jamón</i>	10.5	0.129	0.475	0.147	0.091
	14	0.149	0.689	0.147	0.111
	17.5	0.120	0.831	0.148	0.127
	21	0.156	0.812	0.148	0.115
	24.5	0.107	0.666	0.149	0.111
		RMSE	1.347	0.331	0.329
		B_f	0.24	0.90	0.91
		A_f	4.25	1.16	1.17

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

DO: unidades de densidad óptica

Los resultados obtenidos para el estadístico *RMSE* (Tabla 46), muestran los valores más reducidos, alrededor de 0.330, para los modelos de RN individual y conjunto. Para el índice B_f , se observa que los dos modelos anteriormente citados, son los que mejor ajustan el parámetro *y End*, ya que presentan valores próximos a 1 ($B_f=0.90$ y 0.91), aunque subestiman el comportamiento de *L. mesenteroides* con respecto a las observaciones experimentales (Tabla 46). El índice A_f indica que la mayor exactitud en las predicciones se produce con los modelos de RN individual y conjunto, con

valores cercanos a la unidad, 1.16 y 1.17 respectivamente. No obstante, el modelo de RS presenta un importante factor de diferencia, superior a 4, entre las observaciones y las predicciones, mostrándose por tanto una escasa exactitud en las estimaciones.

Para los tres parámetros de crecimiento (λ , μ_{max} e y_{End}), la falta de ajuste observada entre los valores experimentales y los estimados por los modelos matemáticos puede deberse al hecho de que la composición del medio de cultivo utilizado fue distinta, siendo en el primer caso el jugo de los productos cárnicos (picados y homogeneizados en solución salina y posteriormente esterilizados), y caldo MRS en el segundo.

Además, para la fase de adaptación, el menor ajuste descrito en algunos casos por los índices B_f y A_f , puede ser atribuido a las condiciones fisiológicas y de crecimiento del inóculo de *L. mesenteroides*. De este modo, en el momento de la inoculación del jugo cárnico, las células de este microorganismo pueden mostrar un alto grado de variación que puede explicar estas discrepancias (Castillejo, 2001).

En ocasiones, al utilizar los modelos elaborados en caldo de cultivo, se observan desviaciones en las predicciones, aunque esto no implica que el modelo sea defectuoso (McMeekin y col., 1997). Es normal que nos encontremos desviaciones de las predicciones en alimentos complejos (Gill, 1982). Muchos investigadores han expresado la necesidad de validar modelos predictivos elaborados directamente a partir de alimentos, como la carne (Whiting y Masana, 1994; Walls y Scott, 1996). Esto puede ser fundamentado en base a que, en la formulación de los productos cárnicos, existen ciertos componentes que están ausentes en los medios de cultivo o tienen un comportamiento distinto, afectando significativamente al crecimiento de un microorganismo. Tal es el caso del nitrito sódico, que es estable en medios de cultivo, mientras que es destruido rápidamente por la acción del ascorbato presente en muchos productos cárnicos (Riordan y col., 1998).

En numerosos estudios científicos encontramos referencias de validación de modelos matemáticos elaborados para diversos microorganismos alterantes y patógenos inoculados en alimentos. Podemos observar que los resultados obtenidos en nuestro estudio se encuentran dentro de los rangos observados en otros trabajos científicos.

Los modelos de *fase de adaptación* son generalmente difíciles de validar en alimentos, lo que se demuestra experimentalmente en la estimación de λ , siendo menos repetitiva que el tiempo de generación o tasa de crecimiento (McClure y col., 1994b). Este fenómeno ha sido observado en diversos trabajos, en los cuales existe mayor diferencia entre los valores observados y los predictivos para la fase de adaptación que para la tasa específica de crecimiento (Devlieghere y col., 2000; Devlieghere y col., 2001; Castillejo, 2002).

En la validación en productos cárnicos de modelos elaborados para *L. monocytogenes* se mostró el de Respuesta en Superficie como el más fiable para predecir el parámetro λ , con unos valores calculados para el B_f de 1.03 y para el A_f de 1.17 (Devlieghere y col., 2001).

Trabajos realizados con otro microorganismo patógeno, *S. aureus* (Castillejo, 2002), mostraron óptimos ajustes para la fase de adaptación entre los valores observados en productos cárnicos cocidos y los estimados por el modelo de Respuesta en Superficie en aerobiosis ($B_f= 1.04$ y $A_f= 1.68$) y el modelo tipo Davey en anaerobiosis ($B_f= A_f= 1.94$).

Devlieghere y col. (2000) observaron valores para los índices de validación, sesgo y exactitud, más elevados para la fase de adaptación que para la tasa de crecimiento de *Lactobacillus sake*. Esto indica ajustes algo menores, pero aún cercanos a la unidad, entre los valores observados en productos cárnicos cocidos y los estimados para λ , siendo $B_f= 1.24$ y $A_f= 1.48$ para el modelo extendido de Ratkowsky y $B_f= 1.16$ y $A_f= 1.54$ para el modelo de Respuesta en Superficie. Similares resultados obtuvieron estos autores en la validación en jamón cocido de los modelos elaborados para *Lactobacillus sake* con valores del $B_f= 1.26$ y $A_f= 1.27$ (Devlieghere y col., 1999).

Se han observado valores del índice sesgo, B_f , entre 0.68 y 1.56 y del índice exactitud, A_f , entre 1.74 y 2.36 para la estimación del *tiempo de generación* (inversa de la tasa máxima de crecimiento) de *L. monocytogenes* en carne, llevada a cabo con una serie de modelos específicos hallados en la literatura (te Giffel y Zwietering, 1999). Para este mismo microorganismo patógeno, Nerbrink y col. (1999), observaron valores de $B_f= 0.84$ y $A_f= 1.26$ en estudios de validación realizados en productos cárnicos cocidos.

En estudios llevados a cabo con otro microorganismo patógeno, como es *S. aureus*, para la estimación del tiempo de generación en diversos alimentos (leche, alimentos infantiles, gambas y salmón) se han observado valores para el factor sesgo cercanos a la unidad ($B_f=1.00-1.02$) y algo superiores para el factor exactitud ($A_f=1.17-1.53$) (Ross, 1996).

En el caso de *Pseudomonas ssp.* se han publicado valores para el B_f que van desde 0.92 a 1.13 y A_f entre 1.13 y 1.29 (Neumeyer y col., 1997b) para la predicción del tiempo de generación. Para este mismo parámetro y microorganismo, inoculado en carne estéril, en la validación se han observado valores para el B_f entre 1.11 y 1.60 y A_f entre 1.16 y 1.76 (Lebert y col., 2000).

En relación al parámetro **tasa máxima de crecimiento**, Devlieghere y col. (2001) mostraron un elevado ajuste entre los valores observados en productos cárnicos cocidos inoculados con *L. monocytogenes* y los estimados para la μ_{max} , con modelos de Raíz Cuadrada y Respuesta en Superficie ($B_f= 0.97$ y 0.98 , respectivamente). Este importante ajuste puede ser explicado en base a que, tanto para la recogida de datos con los que se elaborará el modelo como para la validación del mismo, estos autores realizaron experiencias de inoculación de productos cárnicos estériles, donde se eliminaron los microorganismos alterantes que pueden influir en la respuesta de crecimiento del microorganismo patógeno.

También para *L. monocytogenes*, Dalgaard y Jørgensen, (1998) calcularon A_f que oscilaban entre 1.40 y 4.00 para la velocidad de crecimiento en diversos productos pesqueros. En otro tipo de alimentos, como son los productos pesqueros, se han recogido valores del B_f comprendidos entre 1.00 y 3.90 dependiendo del tipo de producto, para la estimación de la μ_{max} de *L. monocytogenes* (Dalgaard y Jørgensen, 1998).

Para el crecimiento de *E. coli* O157: H7 en productos cárnicos cocidos, y en relación con el parámetro tasa de crecimiento, se han observado las mejores estimaciones aplicando modelos de Regresión, ($B_f = 0.93$ y $A_f = 2.42$), seguido por los modelos de Redes Neuronales ($B_f= 1.31$ y $A_f= 1.94$) (Barco, 2001).

Recientes trabajos realizados con *S. aureus* (Castillejo, 2002), han mostrado óptimos ajustes entre los valores de μ_{max} estimados por modelos de Raíz Cuadrada y los observados en productos cárnicos cocidos, siendo los valores $B_f = 1.45$ y 1.12 y $A_f = 1.69$ y 1.49 , para aerobiosis y anaerobiosis respectivamente.

En cuanto a microorganismos alterantes, Devlieghere y col. (2000) observaron elevados ajustes entre los valores observados en productos cárnicos cocidos inoculados con *Lactobacillus sake* y los estimados para la μ_{max} , con el modelo extendido de Ratkowsky y el modelo de Respuesta en Superficie ($B_f = 0.94$ y $A_f = 1.27$ y $B_f = 0.97$ y $A_f = 1.40$, respectivamente). Similares resultados obtuvieron estos autores en la validación en jamón cocido de los modelos elaborados para *Lactobacillus sake* ($B_f = 0.90$ y $A_f \approx 1.23$) (Devlieghere y col., 1999).

La exactitud de los modelos predictivos disminuye cuando el grado de control experimental se reduce. Cuando se trabaja con alimentos no estériles y poco homogéneos o con datos de la literatura da como resultado niveles más bajos de precisión de las estimaciones.

Diversos autores han considerado como aceptables unos valores para el $B_f < 1.15$ y $A_f < 1.60$ en la validación en alimentos de los modelos predictivos (Ross, 1999; Ross y col., 2000a). Según estas indicaciones, cada uno de los modelos elaborados (RS, RN individual y RN conjunto) en anaerobiosis se pueden considerar adecuados para describir el parámetro cinético μ_{max} , descrito por *L. mesenteroides* en productos cárnicos. Sin embargo, en aerobiosis existen discrepancias en cuanto al factor B_f que presenta valores superiores a 1.15, mientras que los valores para el factor A_f sí se sitúan dentro del rango aceptable.

En resumen, en la **validación con jugos cárnicos en anaerobiosis**, el modelo de RS fue el que más claramente estimó el parámetro λ en función de los errores de estimación obtenidos (Tabla 44). Para μ_{max} , cualquiera de los modelos (RS o RN) fue adecuado para predecir este parámetro, ya que describieron valores de $RMSE$, B_f y A_f muy similares, mientras que para y_{End} , los modelos de RN fueron los más ajustados.

5.3.4. Validación con datos obtenidos de la literatura

Hay varios autores que discuten las dificultades y limitaciones encontradas al emplear datos de crecimiento obtenidos a partir de la literatura para validar un modelo predictivo (Cole y col., 1994; Sutherland y col., 1994; Miles y col., 1997; Neumeier y col., 1997b). Cuando los valores de los parámetros de crecimiento son estimados a partir de curvas de crecimiento encontradas en la literatura, estos valores son aproximados. A veces existe falta de información respecto a las condiciones de crecimiento (pH, % NaCl o nitritos, grado de aireación, etc.) o incluso el número de muestras tomadas por curva, por lo que algunos datos pueden ser anómalos.

A partir de datos de crecimiento de BAL recogidos en la literatura, se realizaron las estimaciones proporcionadas por los modelos predictivos de la fase de adaptación y la tasa máxima de crecimiento para *L. mesenteroides*.

Aerobiosis

Los valores predictivos y los observados en diferentes tipos de alimentos para la *fase de adaptación* en atmósfera aeróbica aparecen representados en la Tabla 47, y observamos como en la mayor parte de los datos recogidos, no se detectó λ .

Tabla 47. Valores observados para la fase de adaptación (λ_{OBS}) en diversos alimentos para BAL y estimaciones obtenidas mediante los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) para *L. mesenteroides* en aerobiosis.

<i>Alimento</i>	<i>T (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl (%)</i>	<i>Nitritos (ppm)</i>	λ <i>OBS (h)</i>	λ <i>RS</i>	λ <i>RN individual</i>	λ <i>RN conjunto</i>
<i>Salchichas</i> ^a	12	6.40	2	71	*			
<i>Salchichón</i> ^b	12	6.01	2.8	41	*			
<i>Salchichón</i> ^b	12	6.4	2.8	41	*			
<i>Pescado fresco</i> ^c	10.5	6.25	0.5	0	6.627	5.081	6.627	6.627
					<i>RMSE</i>	0.266	0.005	0.005
					<i>B_f</i>	0.86	1.00	1.00
					<i>A_f</i>	1.16	1.00	1.00

^a Aggelis y col., 1998; ^b Samelis y Metaxopoulos, 1998; ^c Koutsoumanis y Nychas, 2000.

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

Los índices que determinan la fiabilidad de los modelos elaborados, B_f y A_f , han sido calculados (Tabla 47) y muestran valores muy ajustados mediante el modelo de RS, $B_f = 0.86$ y $A_f = 1.16$, si bien los modelos de RN son los que mejor estiman el comportamiento de *L. mesenteroides*, ya que el valor del B_f y A_f es igual a uno.

Para la **tasa máxima de crecimiento** en aerobiosis (Tabla 48), las mayores similitudes entre los valores experimentales y los predictivos se producen al emplear los modelos de RN, donde se observan valores muy ajustados y precisos para los factores sesgo y exactitud, siendo $B_f = 0.99$ y $A_f = 1.07$ para RN individual y $B_f = 1.00$ y $A_f = 1.06$ para RN asociado o conjunto.

Tabla 48. Valores observados para la fase de adaptación (μ_{OBS}) en diversos alimentos para BAL y estimaciones obtenidas mediante los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) para *L. mesenteroides* en aerobiosis.

<i>Alimento</i>	<i>T (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl (%)</i>	<i>Nitritos (ppm)</i>	μ <i>OBS(h⁻¹)</i>	μ <i>RS</i>	μ <i>RN individual</i>	μ <i>RN conjunto</i>
<i>Salchichas</i> ^a	12	6.40	2	71	0.082	0.185	0.085	0.085
<i>Salchichón</i> ^b	12	6.01	2.8	41	0.076	0.151	0.082	0.081
<i>Salchichón</i> ^b	12	6.4	2.8	41	0.083	0.164	0.082	0.083
<i>Pescado fresco</i> ^c	10.5	6.25	0.5	0	0.121	0.320	0.104	0.107
RMSE						0.125	0.009	0.055
B_f						2.20	0.99	1.00
A_f						2.20	1.07	1.06

^a Aggelis y col., 1998; ^b Samelis y Metaxopoulos, 1998; ^c Koutsoumanis y Nychas, 2000.

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

En la validación con datos de la literatura en aerobiosis, seleccionamos los modelos de RN como los que mejor estimaron los parámetros cinéticos λ y μ_{max} , en función de los resultados obtenidos para el estadístico RMSE y los índices B_f y A_f (Tabla 47 y 48).

Anaerobiosis

En la Tabla 49 aparecen los valores observados en diversos alimentos y las estimaciones realizadas por los modelos matemáticos para la *fase de adaptación* en anaerobiosis. Al contrario que ocurría en aerobiosis, en la mayoría de las ocasiones sí hubo periodo de adaptación. El modelo que da lugar a mejores índices de validación es el de RS ($B_f = 1.16$ y $A_f = 3.08$).

Por último, para el parámetro *tasa máxima de crecimiento* en anaerobiosis (Tabla 50), observamos que cualquiera de los modelos producen valores adecuados para los índices B_f y A_f , con valores < 1.99 y < 3.07 respectivamente.

Tabla 49. Valores observados para la fase de adaptación (λ_{OBS}) en diversos alimentos para BAL y estimaciones obtenidas mediante los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) para *L. mesenteroides* en anaerobiosis.

Alimento	T (°C)	pH	NaCl (%)	Nitritos (ppm)	λ OBS (h)	λ RS	λ RN individual	λ RN conjunto
Salchichas ^a	12	6.30	2	71	34.09	8.851	4.582	4.283
Bologna ^b	15.5	6.20	2	50	10.16	5.743	1.457	1.759
Bologna ^b	24.5	6.20	2	50	3.34	3.109	0.328	0.426
Carne de pollo cruda ^c	10.5	6.20	0.5	0	6.411	6.284	4.708	3.289
Carne de pollo cruda ^c	10.5	6.20	0.5	0	*			
Jamón cocido ^d	12	6.30	1.76	71	*			
Carne de ternera cruda ^e	10.5	5.50	0.5	0	0.319	5.405	3.668	2.368
Carne de ternera cruda ^e	10.5	5.50	0.5	0	0.556	5.405	3.668	2.368
Pechuga de pavo cocida ^f	10.5	6.30	2.4	15.4	19	10.129	10.023	9.384
Salchichas ^f	10.5	6.30	2	3	31.61	8.968	8.646	8.170
					RMSE	1.316	1.764	1.432
					B_f	1.16	0.59	0.52
					A_f	3.08	3.61	3.34

^a Korkeala y col., 1989; ^b Muermans y col., 1993; ^c Kakouri y Nychas, 1994; ^d Giannuzzi y col., 1998; ^e Samelis y col., 1998; ^f Pexara y col., 2002.

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

Tabla 50. Valores observados para la fase de adaptación (μ_{OBS}) en diversos alimentos para BAL y estimaciones obtenidas mediante los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) para *L. mesenteroides* en anaerobiosis.

<i>Alimento</i>	<i>T (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>NaCl (%)</i>	<i>Nitritos (ppm)</i>	μ <i>OBS (h⁻¹)</i>	μ <i>RS</i>	μ <i>RN individual</i>	μ <i>RN conjunto</i>
<i>Salchichas^a</i>	12	6.30	2	71	0.043	0.150	0.143	0.141
<i>Bologna^b</i>	15.5	6.20	2	50	0.317	0.175	0.175	0.191
<i>Bologna^b</i>	24.5	6.20	2	50	0.680	0.465	0.780	0.802
<i>Carne de pollo cruda^c</i>	10.5	6.20	0.5	0	0.042	0.283	0.389	0.444
<i>Carne de pollo cruda^c</i>	10.5	6.20	0.5	0	0.106	0.283	0.389	0.444
<i>Jamón cocido^d</i>	12	6.30	1.76	71	0.273	0.162	0.160	0.161
<i>Carne de ternera cruda^e</i>	10.5	5.50	0.5	0	0.756	0.257	0.293	0.160
<i>Carne de ternera cruda^e</i>	10.5	5.50	0.5	0	0.035	0.257	0.293	0.160
<i>Pechuga de pavo cocida^f</i>	10.5	6.30	2.4	15.4	0.058	0.163	0.122	0.111
<i>Salchichas^f</i>	10.5	6.30	2	3	0.042	0.187	0.142	0.139
					RMSE	0.226	0.234	0.267
					B_f	1.84	1.99	1.81
					A_f	3.07	3.01	3.03

^a Korkeala y col., 1989; ^b Muermans y col., 1993; ^c Kakouri y Nychas, 1994; ^d Giannuzzi y col., 1998; ^e Samelis y col., 1998; ^f Pexara y col., 2002.

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f: factor sesgo (Bias)

A_f: factor exactitud (Accuracy)

En la validación con datos de la literatura en anaerobiosis, en función de los resultados obtenidos para el estadístico *RMSE* y los índices *B_f* y *A_f* (Tabla 49 y 50) seleccionamos el modelo de RS para el parámetro λ y cualquiera de los modelos, RS o RN para estimar la μ_{max} .

En general, las predicciones no se han ajustado a los datos de crecimiento de *L. mesenteroides* encontrados en la literatura, lo cual se refleja en los valores de los índices *RMSE*, *B_f* y *A_f*, que se muestran alejados del valor de concordancia perfecta.. Este hecho puede ser debido, entre otras causas, a que el cálculo de los parámetros de crecimiento se ha realizado a partir de curvas de crecimiento, a la falta de información en algunas investigaciones (concentración de NaCl, pH, etc.) y a las diferencias existentes entre *L. mesenteroides* y otras BAL.

En algunos estudios científicos encontramos referencias de validación, con datos recogidos de la literatura, de modelos matemáticos elaborados para diversos microorganismos patógenos y alterantes en alimentos.

Lebert y col. (2000) validaron el modelo elaborado para describir el tiempo de generación de *L. monocytogenes* con datos de la literatura en diversos alimentos (productos cárnicos, pesqueros, lácteos y vegetales), oscilando los valores del B_f y A_f entre 0.61- 1.10 y 1.22 y 1.67 respectivamente. Para otro microorganismo patógeno como es *E. coli* O157: H7, Barco (2001) observó valores de $B_f= 0.71$ y $A_f=1.65$ y $B_f= 0.71$ y $A_f=1.65$ para la estimación de μ_{max} en productos cárnicos mediante modelo de regresión y redes neuronales respectivamente. En otro estudio realizado con *S. aureus* (Castillejo, 2002), para estos índices de validación se observaron valores más variables, según el modelo de predicción empleado. Así, los mejores resultados para la μ_{max} en aerobiosis se obtuvieron con el modelo de RS ($B_f= 0.87$ y $A_f=2.30$), mientras que para el resto de modelos elaborados, los índices mostraron escaso ajuste, siendo $B_f < 0.56$ y $A_f > 2.20$.

En el caso de *Pseudomonas ssp.* se han publicado valores de validación, con datos recogidos de la literatura, de $B_f= 0.80$ y $A_f=1.31$ para la predicción del tiempo de generación en productos cárnicos (Neumeyer y col., 1997b). Para este mismo parámetro y microorganismo, se ha realizado la validación de los modelos elaborados con datos de la literatura para productos lácteos y cárnicos, obteniendo valores para el B_f entre 0.81 y 1.57 y A_f entre 1.18 y 1.57 (Lebert y col., 2000).

En la validación de los modelos predictivos con datos recogidos de la literatura Armas (1996) consideraron como aceptables unos valores para el B_f entre 0.60-3.99 para microorganismos patógenos y alterantes. Este criterio es menos estricto debido a que las dificultades y limitaciones encontradas en este tipo de validación son importantes. Según este criterio, y como resumen de la **validación con datos de la literatura**, cada uno de los modelos elaborados (RS, RN individual y RN conjunto) se podrían considerar adecuados para describir el crecimiento de *L. mesenteroides* tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, sin embargo, consideramos como el más favorable el modelo de RS en anaerobiosis, pues es el que muestra índices más ajustados a la unidad ($B_f= 1.16$ y $A_f= 3.08$).

5.3.5. Validación con el programa FMM

La estimación del crecimiento obtenida con los modelos matemáticos elaborados se compararon con las predicciones que proporcionan el programa Food MicroModel (FMM), los cuales están confeccionados con datos de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en medio de cultivo cuantificado a partir de recuento en placa. Con este programa sólo se pueden obtener predicciones de crecimiento en aerobiosis para μ_{max} y λ , y no se incluye la concentración de nitritos como factor ambiental.

En primer lugar se compararon los valores predictivos proporcionados por el programa FMM con los valores de μ_{max} y λ obtenidos mediante los modelos matemáticos (RS y RN) en **caldo de cultivo** MRS. En la Tabla 51 aparecen los valores proporcionados por el FMM y los estimados por los modelos elaborados para la fase de adaptación. Podemos observar como, en general, los valores del FMM son superiores a las predicciones de los modelos, siendo los índices estadísticos más ajustados los determinados mediante el modelo de RN individual ($B_f= 0.64$ y $A_f= 1.57$).

Para la tasa máxima de crecimiento, los valores obtenidos con el programa FMM figuran en la Tabla 52 junto con los valores predictivos de los modelos matemáticos elaborados. Se observa como los valores para μ_{max} obtenidos mediante el FMM son inferiores a los valores estimados por RS o RN. La reducida coincidencia entre ellos se muestra en los índices estadísticos B_f y A_f , que en todos los casos fueron superiores a 2.

Seguidamente se compararon los valores proporcionados por el programa FMM con los valores de μ_{max} y λ descritos por *L. mesenteroides* en **productos cárnicos** cocidos. Para la fase de adaptación, al igual que ocurrió en el caldo de cultivo MRS, los valores obtenidos con el FMM son superiores a los estimados por los modelos de RS y RN (Tabla 51). Las menores diferencias se observaron al emplear el modelo de RN individual, donde los valores B_f y A_f fueron 0.83 y 1.22 respectivamente, lo cual indica que este modelo es el que realiza mejores predicciones.

Tabla 51. Valores obtenidos mediante el programa Food MicroModel (FMM) para la fase de adaptación (λ , h) de *Lactobacillus plantarum* y valores predictivos obtenidos con los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en aerobiosis.

	T ($^{\circ}\text{C}$)	pH	NaCl (%)	λ <i>FMM</i> (h)	λ <i>RS</i>	λ <i>RN individual</i>	λ <i>RN conjunto</i>
Caldo	10.5	6.2	0.5	25.3	4.9	5.4	3.9
MRS	11.0	6.2	0.5	22.1	4.7	5.2	3.9
	12.0	6.2	0.5	17.3	4.4	4.7	3.8
	13.0	6.2	0.5	14.0	4.1	4.3	3.8
	14.0	6.2	0.5	11.5	3.8	4.0	3.8
	15.0	6.2	0.5	9.6	3.5	3.7	3.7
	16.0	6.2	0.5	8.2	3.2	3.5	3.7
	17.0	6.2	0.5	7.0	3.0	3.3	3.5
	17.5	6.2	0.5	6.5	2.9	3.2	3.4
	18.0	6.2	0.5	6.1	2.8	3.1	3.3
	19.0	6.2	0.5	5.3	2.6	3.0	3.0
	20.0	6.2	0.5	4.7	2.4	2.8	2.7
	21.0	6.2	0.5	4.2	2.2	2.7	2.4
	22.0	6.2	0.5	3.8	2.1	2.7	2.1
	23.0	6.2	0.5	3.4	1.9	2.6	2.0
	24.0	6.2	0.5	3.1	1.8	2.5	1.9
	24.5	6.2	0.5	3.0	1.7	2.5	1.8
				RMSE	0.977	0.870	0.991
				B_f	0.54	0.64	0.56
				A_f	1.86	1.57	1.78
Productos	10.5	6.2	0.5	25.3	4.9	9.3	7.4
cárnicos	13.5	6.2	0.5	12.6	3.9	7.8	7.4
	17.7	6.2	0.5	6.3	2.9	6.5	6.8
				RMSE	1.247	0.642	0.775
				B_f	0.53	0.83	0.80
				A_f	1.87	1.22	1.29
Jugo	10.5	6.2	0.5	25.3	4.9	5.4	3.9
cárnico	14.0	6.2	0.5	11.5	3.8	4.0	3.8
	17.5	6.2	0.5	6.5	2.9	3.2	3.4
	21.0	6.2	0.5	4.2	2.2	2.7	2.4
	24.5	6.2	0.5	3.0	1.7	2.5	1.8
				RMSE	1.029	0.917	1.073
				B_f	0.53	0.64	0.55
				A_f	1.89	1.56	1.82

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

Tabla 52. Valores obtenidos mediante el programa Food MicroModel (FMM) para la tasa máxima de crecimiento (μ , h^{-1}) de *Lactobacillus plantarum* y valores predictivos obtenidos con los modelos de Respuesta en Superficie (RS) y Redes Neuronales (RN) en aerobiosis.

	T ($^{\circ}C$)	pH	$NaCl$ (%)	μ <i>FMM</i> (h^{-1})	μ <i>RS</i>	μ <i>RN individual</i>	μ <i>RN conjunto</i>
Caldo	10.5	6.2	0.5	0.033	0.317	0.190	0.206
MRS	11.0	6.2	0.5	0.038	0.312	0.190	0.205
	12.0	6.2	0.5	0.049	0.305	0.190	0.204
	13.0	6.2	0.5	0.061	0.303	0.191	0.203
	14.0	6.2	0.5	0.074	0.307	0.192	0.203
	15.0	6.2	0.5	0.088	0.316	0.195	0.204
	16.0	6.2	0.5	0.104	0.330	0.200	0.209
	17.0	6.2	0.5	0.121	0.349	0.211	0.220
	17.5	6.2	0.5	0.130	0.360	0.220	0.228
	18.0	6.2	0.5	0.139	0.373	0.231	0.238
	19.0	6.2	0.5	0.158	0.403	0.263	0.267
	20.0	6.2	0.5	0.179	0.438	0.304	0.305
	21.0	6.2	0.5	0.201	0.478	0.344	0.345
	22.0	6.2	0.5	0.224	0.523	0.374	0.380
	23.0	6.2	0.5	0.248	0.573	0.391	0.405
	24.0	6.2	0.5	0.273	0.629	0.400	0.421
24.5	6.2	0.5	0.286	0.659	0.402	0.426	
				RMSE	0.272	0.124	0.135
				B_f	3.39	2.16	2.26
				A_f	3.39	2.16	2.26
Productos	10.5	6.2	0.5	0.033	0.317	0.095	0.102
cárnicos	13.5	6.2	0.5	0.067	0.304	0.096	0.100
	17.7	6.2	0.5	0.133	0.365	0.108	0.112
				RMSE	0.252	0.042	0.046
				B_f	4.93	1.50	1.57
				A_f	4.93	1.71	1.76
Jugo	10.5	6.2	0.5	0.033	0.317	0.190	0.206
cárnico	14.0	6.2	0.5	0.074	0.307	0.192	0.203
	17.5	6.2	0.5	0.130	0.360	0.220	0.228
	21.0	6.2	0.5	0.201	0.478	0.344	0.345
	24.5	6.2	0.5	0.286	0.659	0.402	0.426
				RMSE	0.284	0.127	0.139
				B_f	3.60	2.27	2.38
				A_f	3.60	2.27	2.38

RMSE: raíz del error cuadrático medio

B_f : factor sesgo (Bias)

A_f : factor exactitud (Accuracy)

En la validación de los modelos predictivos en productos cárnicos con los valores obtenidos mediante el FMM, se observó como también el modelo de RN individual es el que mejor estima la tasa máxima de crecimiento, siendo $B_f = 1.50$ y $A_f = 1.71$ (Tabla 52).

Por último, se utilizaron las estimaciones de μ_{max} y λ descritos por *L. mesenteroides* en **jugo cárnico** para compararlos con los valores obtenidos con el programa FMM. La fase de adaptación mostró valores más elevados obtenidos con el FMM que los estimados por los modelos de RS y RN (Tabla 51). Los resultados para los índices B_f y A_f mostraron valores muy similares a los observados al comparar las predicciones del FMM y de los modelos en caldo de cultivo, siendo 0.64 y 1.56 respectivamente para el modelo de RN individual.

Los valores obtenidos con el programa FMM y los predictivos mediante los modelos matemáticos para la tasa máxima de crecimiento, figuran en la Tabla 52. Se observó que los valores para μ_{max} obtenidos mediante el FMM son inferiores a los valores estimados por los modelos, lo cual se reflejó en unos factores sesgo y exactitud alejados de la unidad (B_f y $A_f > 2$).

Las diferencias encontradas tanto para la fase de adaptación como para la tasa de crecimiento pueden deberse principalmente a que las predicciones del FMM fueron elaboradas a partir del crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, mientras que las estimaciones de los modelos matemáticos se elaboraron a partir del crecimiento de *L. mesenteroides*. Las diferencias existentes pueden también deberse al hecho de que el FMM al realizar las predicciones no recoge factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos, como ciertos conservantes (NaNO_2), atmósfera gaseosa (aeróbica y anaeróbica), así como interacciones microbianas y composición de los alimentos (Dalgaard y Jørgensen, 1998). Además, el programa FMM está confeccionado con datos de crecimiento de recuento en placa y ajustados a la ecuación de Gompertz (Gibson y col., 1987), mientras que los modelos matemáticos se elaboraron a partir de valores de absorbancia mediante turbidimetría y ajustados a la fórmula de Baranyi y Roberts (1994).

Otros autores obtuvieron valores similares a los nuestros en la validación de modelos matemáticos con el programa Food MicroModel y otros como el Pathogen Modelling Program. Castillejo (2002) observó escasas coincidencias entre los valores obtenidos con estos programas y los estimados mediante los modelos elaborados en su estudio para *S. aureus*. Mientras que en nuestro estudio las predicciones obtenidas con el programa FMM fueron seguras, en un estudio de validación llevado a cabo por Walls y col., (1996) con *S. aureus* en alimentos estériles infantiles se determinó un valor del $B_f = 0.28$, lo que significa que la respuesta observada fue superior a la predictiva, dando como resultado predicciones peligrosas.

En la evaluación del programa FMM para predecir el tiempo de generación descrito por *L. monocytogenes* en carnes, se observaron los índices $B_f = 0.74$ y $B_f = 1.73$ (te Giffel y Zwietering, 1999). El modelo de Respuesta en Superficie desarrollado por Nerbrink y col., (1999) fue probado comparando las predicciones para la tasa máxima de crecimiento de *L. monocytogenes* obtenidos por medio del FMM, mostrando unos valores del $B_f = 0.84$ y $B_f = 1.20$. Otros autores (Dalgaard y Jørgensen, 1998) observaron valores elevados para los índices B_f y $A_f = 5.2$, al comparar las predicciones obtenidas con el programa FMM y el crecimiento observado en salmón ahumado naturalmente contaminado con *L. monocytogenes*.

Como resumen de la **validación de los modelos con el programa FMM** seleccionamos el modelo de RN individual, tanto para datos en caldo, en productos cárnicos y en jugo cárnico, ya que se obtuvieron los menores valores para el estadístico *RMSE* y valores más ajustados para los índices B_f y A_f .

5.4. Selección de modelos predictivos

A lo largo de la presentación de los resultados, se han ido describiendo qué modelos eran los más adecuados y los que mejor estimaban los parámetros λ , μ_{max} e y_{End} según el tipo de validación realizada. Sin embargo, a efectos prácticos, se hace necesario unificar y seleccionar un único tipo de modelo que estime los tres parámetros cinéticos de *L. mesenteroides*, por lo que se han seleccionado los modelos de RN individual tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Esta elección se basa en el hecho de que los errores de estimación (*RMSE* y *SEP*) obtenidos en la elaboración del modelo son muy reducidos, y los índices B_f y A_f son iguales o próximos a 1, fenómeno también observado en la validación interna o generalización del modelo. El modelo de RN, en comparación con el modelo de RS, es más complejo y requiere en su elaboración mayor inversión de tiempo y esfuerzo, sin embargo, ha sido seleccionado ya que en la validación en el jugo y productos cárnicos, etapa fundamental en el desarrollo de un modelo predictivo, el modelo de RN claramente estimó de forma más adecuada el crecimiento de *L. mesenteroides*.

5.5. Aplicación de los modelos predictivos

Los modelos predictivos desarrollados presentan notables aplicaciones que pueden suponer una importante herramienta para la industria alimentaria, siendo la más destacable, la predicción del deterioro de un alimento por microorganismos alterantes, y por tanto, el periodo de vida comercial de dicho producto.

Tal y como se expuso en Material y Métodos, se ha realizado el análisis sensorial de muestras de pechuga de pollo, pechuga de pavo y jamón cocido envasadas al vacío, con el fin de establecer la vida media comercial de tales alimentos, es decir, la vida media observada. A su vez se ha estimado la vida media predictiva para estos productos a partir de los valores predictivos de λ , μ_{max} e y_{End} , mediante la fórmula desarrollada por Baranyi y Roberts (1994).

5.5.1. Estimación de vida comercial

5.5.1.1. Análisis sensorial

El análisis sensorial de las muestras de pavo, jamón y pollo cocidos fue realizado de forma paralela a la monitorización de los microorganismos causantes de alteración más importantes de nuestro estudio, las BAL, en dichos productos cárnicos (Figuras 11, 12 y 13).

Para cada una de las muestras se realizó el análisis de los atributos olor, color, sabor, aspecto y presencia de limo a lo largo del tiempo, durante un periodo máximo de 51 días. No se observaron diferencias significativas entre las valoraciones realizadas por cada uno de los jueces entrenados ($p > 0.05$), que asignaron un valor entre 9 y 1 a las muestras, considerándose el valor $y \leq 5$ como el momento en el que se inicia el deterioro del producto (Witting de Penna, 1981, Anzaldúa-Morales, 1994).

Para los tres productos cárnicos, se observó que, al final del periodo de análisis, las menores puntuaciones se correspondieron con los atributos olor y sabor, siendo indicio de que éstos fueron los más determinantes en la aceptación o rechazo de las muestras. Se calculó la correlación existente entre la aceptación general y el sabor y olor, obteniéndose valores muy elevados, $r > 0.96$ y superiores al resto de atributos. Todo esto corroboró la mayor influencia del olor y el sabor en la vida comercial de los productos cárnicos cocidos, coincidiendo con otros estudios, que señalan como defectos sensoriales más determinantes el olor y sabor a fermentado y agrio (Korkeala y Alanko, 1988; Korkeala y col., 1989; Korkeala y Björkroth, 1997; Kotzekidou y Bloukas, 1996; Samelis y col., 1998). Incluso algunos autores han establecido como criterio para finalizar el estudio sensorial de un producto el momento en que los jueces determinan una media de olor y sabor por debajo de 3 en una escala de 1 a 5, entendiendo que ya han perdido toda aceptabilidad sensorial (Kotzekidou y Bloukas, 1996).

5.5.1.2. Vida comercial observada

Una vez realizado el análisis sensorial, se estimó la vida comercial observada en los productos cárnicos calculando la calidad sensorial global (Q). Para ello, y al igual que en otros trabajos (Bruna y col., 2001), los jueces determinaron la importancia de los atributos, asignándoles un factor de corrección (f_i) de 1 para olor y sabor, 0.1 para aspecto y limo y 0.01 para color. Posteriormente se calcularon los nuevos límites de deterioro, que fueron $y= 5.6$ para jamón cocido y pollo cocido e $y= 5.2$ para pavo cocido, siendo estos valores imprescindibles para la estimación de la vida comercial.

En las Tablas 53, 54 y 55 se muestran los valores para la calidad sensorial global de cada uno de los productos cárnicos a lo largo del tiempo. Para un mismo periodo de tiempo y a las temperaturas más bajas, las puntuaciones más reducidas se obtuvieron, en general, para el pavo cocido, es decir, la alteración fue más rápida; sin embargo, a las temperaturas 13.5 y 17.7°C, las menores puntuaciones se observaron en las muestras de jamón cocido. A partir de estos valores, mediante regresión polinómica, se estimó la vida media comercial del pollo, pavo y jamón cocidos (Figuras 35, 36 y 37 respectivamente), en relación a sus correspondientes límites de rechazo.

Tabla 53. Valores de calidad sensorial global observados en pechuga de pollo cocida.

TIEMPO (días)	Valor Q				
	Pollo				
	2.3°C	6.5°C	10.5°C	13.5°C	17.7°C
0	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
7	*	*	8.07	7.58	7.83
14	8.04	7.36	7.43	6.78	5.82
21	*	*	*	5.78	6.19
27	5.66	5.46	5.38	4.58	5.19
31	*	*	*	5.00	4.45
35	*	*	*	5.00	5.61
42	5.42	5.28	5.22	4.84	4.35

*: no determinado

Tabla 54. *Valores de calidad sensorial global observados en pechuga de pavo cocida.*

TIEMPO (días)	Valor Q				
	2°C	6.5°C	10.5°C	13.5°C	17.7°C
0	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
3	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
7	7.53	7.53	7.53	6.82	6.82
10	7.48	7.39	7.30	6.79	6.57
14	7.00	7.00	6.05	6.05	6.05
17	5.95	5.95	5.95	5.81	5.72
21	6.34	6.02	5.89	5.56	5.41
24	5.84	5.84	5.69	4.88	4.86
38	4.00	4.00	4.00	3.91	3.53
45	4.05	3.46	3.37	3.59	3.59

Tabla 55. *Valores de calidad sensorial global observados en pechuga de pollo cocida.*

TIEMPO (días)	Valor Q				
	2°C	6.5°C	10.5°C	13.5°C	17.7°C
0	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
3	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
7	9.00	9.00	8.10	7.13	7.13
17	7.71	7.26	7.02	6.35	4.45
28	6.59	6.39	5.96	4.89	3.51
35	6.02	5.55	5.60	4.90	3.76
43	6.89	5.09	4.19	2.39	1.94
51	5.41	4.50	3.96	3.48	2.57

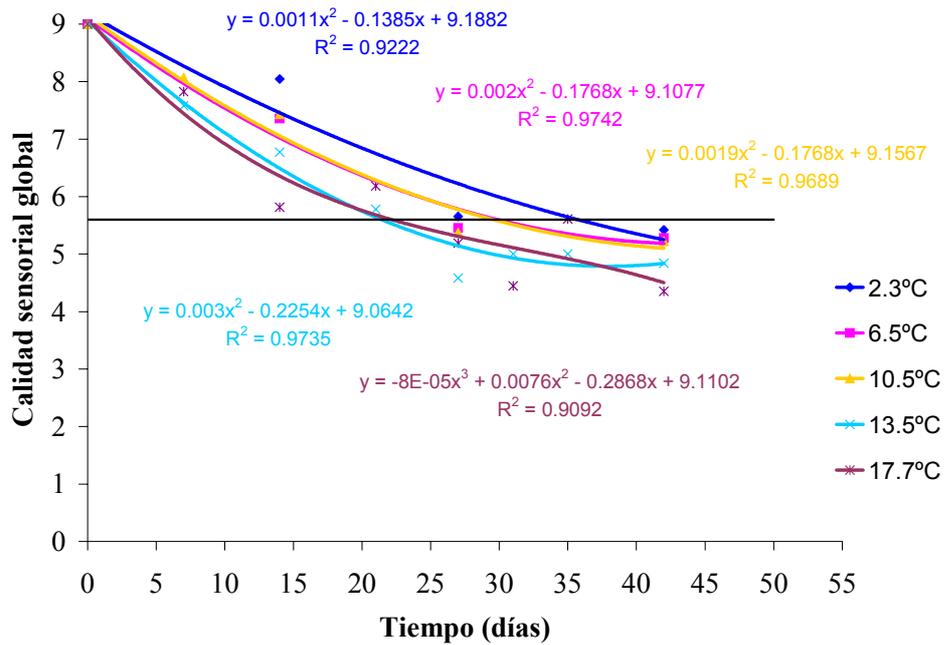


Figura 35. Regresión polinómica de la calidad sensorial global observados a diversas temperaturas en pechuga de pollo cocida.

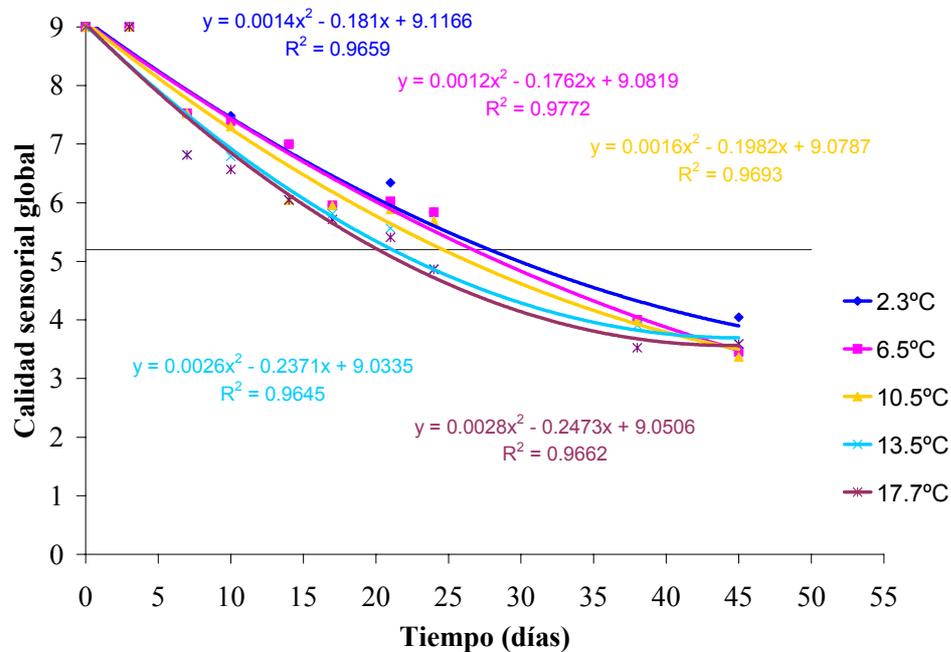


Figura 36. Regresión polinómica de la calidad sensorial global observada a diversas temperaturas en pechuga de pavo cocida.

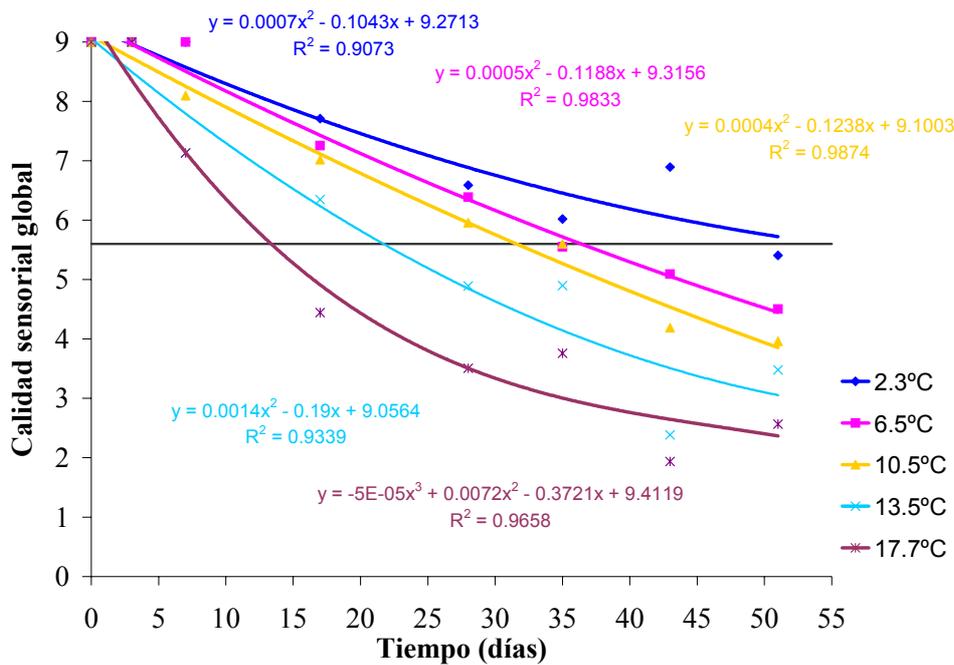


Figura 37. Regresión polinómica de la calidad sensorial global observada a diversas temperaturas en jamón cocido.

Los valores de vida media estimados para cada producto y temperatura de almacenamiento aparecen en la Tabla 56, así como el recuento de BAL correspondiente a ese periodo de tiempo. Se observó que las muestras almacenadas a la temperatura más baja de nuestro estudio, 2.3°C, conservaron su calidad sensorial hasta casi el final del periodo experimental (37 y 49 días) para el pollo y el jamón respectivamente, mientras que para el pavo, este tiempo fue mucho menor (31 días). En general, se observó una gran similitud en la vida media observada para pollo y pavo a todas las temperaturas, y entre éstos productos y el jamón para las temperaturas más elevadas, 13.5 y 17.7°C (Tabla 56), si bien, no hubo diferencias significativas entre los valores resultantes para los tres productos cárnicos ($p > 0.05$). Para las temperaturas de abuso, 13.5 y 17.7°C, se determinaron tiempos de vida media próximos a 21 y 16 días respectivamente.

Tabla 56. Vida media comercial estimada en productos cárnicos cocidos y el correspondiente recuento de bacterias ácido lácticas (BAL).

Temperatura (°C)	Vida comercial (días)			BAL (Log N, ufc/g)		
	Pollo	Pavo	Jamón	Pollo	Pavo	Jamón
2.3	37	31	49	4.9	3.9	4.7
6.5	27	27	36	5.3	4.3	4.7
10.5	27	25	31	6.3	4.5	6.7
13.5	21	22	21	8.1	7.6	6.9
17.7	16	20	12	8.4	7.8	7.1

En la bibliografía, existen numerosas referencias de vida comercial de diversos tipos de productos cárnicos procesados y envasados al vacío (Tabla 57). Se mostraron grandes diferencias para una misma temperatura y tipo de producto, como es el caso observado en salchichas almacenadas a 4- 5°C, donde el tiempo de vida comercial varió entre 20-32 y 98 días (Ahvenainen y col., 1990; Blickstad y Molin, 1984, respectivamente). Similar situación se observó en jamón cocido a 4°C, con periodos de vida comercial variables entre 17 días y 40 días (Kotzekidou y Bloukas, 1996; Samelis y col, 1998 respectivamente). Estas diferencias podrían deberse a la variedad de ingredientes empleados en la formulación de los productos, a los diversos modos de elaboración y producción, así como a la diferente actividad microbiana, enzimática, etc. según la muestra y el alimento.

De entre todos los trabajos científicos reseñados en la Tabla 57, destacan por la similitud a los resultados obtenidos en nuestro estudio, los realizados con jamón cocido envasado al vacío y almacenado a 4 y 12°C, en los cuales la vida comercial fue 40 y 18 días respectivamente (Samelis y col., 1998). Los resultados obtenidos por Korkeala y col. (1989) en salchichas cocidas envasadas al vacío también se asemejaron a los tiempos de vida comercial estimados en nuestro trabajo, siendo 43, 29 y 17 días para 4, 8 y 12°C respectivamente.

Las diferencias en el tiempo de vida comercial existentes entre nuestro estudio y otras referencias científicas (Tabla 57) podrían deberse a que en éstas últimas no se describen aspectos tales como características organolépticas evaluadas, tipo de prueba y escala de valoración sensorial empleadas, etc.

Tabla 57. *Tiempos de vida comercial de diversos productos cárnicos procesados envasados al vacío y almacenados a diferentes temperaturas.*

PRODUCTO CÁRNICO	TEMPERATURA (°C)	VIDA COMERCIAL (días)	REFERENCIA
Bologna	3	14	Alm y col., 1961
Bologna	4	27-29	Andersen, 1989
Salchicha Viena	8	10-30	Mukherji y Qvist, 1981
Salchicha Viena	5	20-32	Ahvenainen y col., 1990
Salchicha Viena	6	14	Alm y col., 1961
Salchicha Frankfurt	4	98	Blickstad y Molin, 1984
Salchicha Frankfurt	2	42	Zurera Cosano y col., 1988
Salchicha Frankfurt	7	28	Zurera Cosano y col., 1988
Salchicha a vacío	2	55	Korkeala y col., 1989
Salchicha a vacío	4	43	Korkeala y col., 1989
Salchicha a vacío	8	29	Korkeala y col., 1989
Salchicha a vacío	12	17	Korkeala y col., 1989
Emulsión para salchicha	4	26	Borch y Nerbrink, 1989
Jamón cocido	4-8	14-18	Stojanowic y Flemming, 1988
Jamón cocido	4	17	Kotzekidou y Bloukas, 1996
Jamón cocido	4	18-20	Ambrosiadis y Georgakis, 1993
Jamón cocido	4-8	22	Silla y Simonsen, 1985
Jamón cocido	5	28	Ahvenainen y col., 1990
Jamón cocido	12	18	Samelis y col., 1998
Jamón cocido	4	40	Samelis y col., 1998

La vida media comercial observada para cada producto cárnico y para cada temperatura, se relacionó con el nivel de BAL alterantes (Tabla 56). Este nivel microbiano (Log BAL, ufc/ g) se calculó a partir de las curvas de crecimiento ajustadas con el modelo de Baranyi y Roberts (Figuras 11, 12 y 13). Se observaron diferencias en los recuentos alcanzados según el productos, sin embargo, en las muestras almacenadas a las temperaturas más elevadas de nuestro estudio (13.5 y 17.7°C) se alcanzaron elevados niveles de BAL, entre 10^6 - 10^8 ufc/g. recuentos considerados por numerosos autores como criterio para determinar la vida comercial de los alimentos (Reuter, 1970; Korkeala y col., 1987 y 1989; Korkeala y Alanko, 1988; García Gimeno y Zurera Cosano, 1997; Korkeala y Björkroth, 1997; García Gimeno y col., 1998).

5.5.1.3. Vida comercial predictiva

La vida media predictiva de los productos cárnicos cocidos se calculó mediante la fórmula desarrollada por Baranyi y Roberts (1994), a partir de los valores estimados para los parámetros cinéticos λ , μ_{max} e y_{End} por el modelos secundarios seleccionado de RN individual (Tabla 58). En este caso, la vida comercial sólo fue calculada para las tres temperaturas más elevadas (10.5, 13.5 y 17.7°C) ya que las restantes no se incluyeron en el rango de temperaturas del diseño experimental para elaborar los modelos predictivos.

Para estimar el valor del parámetro y_{End} mediante los modelos predictivos, previamente fue necesario transformar los valores observados del recuento de BAL, para los productos cárnicos, en valores de absorbancia mediante la recta de calibrado elaborada, según se describe en la sección 5.2.

Para calcular la vida comercial predictiva, definimos este periodo como el tiempo transcurrido en alcanzarse los niveles 10^6 - 10^8 de BAL, criterio descrito por diversos autores (Korkeala y col., 1987; 1989; Korkeala y Alanko, 1988; García Gimeno y Zurera Cosano, 1997; Korkeala y Björkroth, 1997; García Gimeno y col., 1998).

Tabla 58. Valores predictivos para los parámetros cinéticos fase de adaptación (λ), tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}) y densidad máxima de población (y_{End}) estimados por el modelo de Redes Neuronales (RN) individual en productos cárnicos cocidos.

Producto	T (°C)	RN individual		
		λ	μ_{max}	y_{End}
Pollo	10.5	291.17	0.0067	7.52
	13.5	230.07	0.0068	7.55
	17.7	186.28	0.0080	7.59
Pavo	10.5	300.70	0.0063	7.65
	13.5	235.92	0.0064	7.70
	17.7	190.10	0.0078	7.75
Jamón	10.5	287.49	0.0068	7.68
	13.5	225.09	0.0069	7.72
	17.7	181.10	0.0082	7.76

En la Tabla 59 se muestran los tiempos de vida comercial estimados mediante el modelo secundario de RN individual, tiempos que fueron muy similares a los observados mediante el análisis sensorial en los productos cárnicos para un nivel microbiano de $10^{6.5}$ ufc/g.

La vida media predictiva (PRED) fue en general más corta que la observada (OBS), tal y como se observa en la Tabla 59. Estos tiempos de vida media estimados más cortos que los experimentales, fenómeno denominado “retraso en la alteración”, ya fue descrito anteriormente en la literatura en productos cárnicos cocidos (Reuter, 1970; Egan y Shay, 1982; Korkeala y col., 1987; 1989, Korkeala y Alanko, 1988; Korkeala y Björkroth, 1997; Samelis y col., 1998). Otros autores destacan que este tiempo puede variar considerablemente dependiendo del tipo de alimento, la actividad de los microorganismos alterantes y los factores intrínsecos y extrínsecos que afectan a éstos (Huis in't Veld, 1996). Varios son los autores que subrayan la dificultad existente en el uso de los resultados microbiológicos para la evaluación de la calidad y la vida media de las muestras objeto de estudio (Korkeala y col., 1989; Huis in't Veld, 1996). Así, para conseguir un mejor entendimiento de los mecanismos que intervienen en la alteración de los alimentos, se haría necesario un estudio completo, incluyendo la identificación de los microorganismos alterantes así como las interacciones de éstos con otros microorganismos o sus metabolitos y la interacción existente entre la alteración microbiológica y bioquímica (Huis in't Veld, 1996).

Tabla 59. Vida comercial observada (OBS) y vida comercial predictiva (PRED) estimada por los modelos de Redes Neuronales individual para alcanzar diversos recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL) en productos cárnicos cocidos.

Producto	Vida comercial OBS (días)		Vida comercial PRED (días)				
	T (°C)	Sensorial	10^6 ufc/g BAL	$10^{6.5}$ ufc/g BAL	10^7 ufc/g BAL	$10^{7.5}$ ufc/g BAL	10^8 ufc/g BAL
<i>Pollo</i>	10.5	27	17.4	22.9	29.4	51.7	*
	13.5	21	14.9	20.1	26.3	42.5	*
	17.7	16	12	17	22	33	*
<i>Pavo</i>	10.5	25	18.0	23.5	29.7	41.5	*
	13.5	22	15.3	20.5	26.4	36.7	*
	17.7	20	12.4	16.7	21.4	29.0	*
<i>Jamón</i>	10.5	31	17.0	22.1	27.8	38.0	*
	13.5	21	14.4	19.3	24.8	33.9	*
	17.7	12	11.8	15.8	20.3	27.4	*

*: no alcanzó el recuento 10^8 ufc/g

La obtención de tiempos de vida media predictivos más cortos que los observados fue importante, ya que los modelos secundarios de RN individual realizaron estimaciones adecuadas desde el punto de vista comercial, al anticiparse a la alteración sensorial de los productos cárnicos cocidos.

5.5.2. Formulación de nuevos productos

Los modelos predictivos elaborados permiten hacer predicciones acerca de las consecuencias de cambios en la formulación para determinar la seguridad de los productos alimenticios.

El consumo de productos con bajo contenido de sal tiene un relevante interés para aquella parte de población con problemas de hipertensión. Como resultado a esta demanda han aparecido recientemente en el mercado productos cárnicos cocidos sin sal. Se propone un ejemplo de cambio de formulación para demostrar las posibilidades de aplicación de los modelos predictivos elaborados. Las nuevas predicciones de crecimiento se realizaron dentro del intervalo de los factores ambientales estudiados, ya que las predicciones no deben hacerse por extrapolación, fuera del rango de las variables estudiadas, ya que las estimaciones no serían fiables (Baranyi y col., 1996).

En el ejemplo gráfico propuesto en la Figura 38 se muestra la evolución de la tasa máxima específica de crecimiento estimada mediante el modelo de RN individual

en condiciones de anaerobiosis para *L. mesenteroides* bajo una nueva formulación de productos, representada por modificaciones en la concentración de cloruro sódico. A una temperatura elevada de 17.5°C en un producto con un valor fijo de pH de 6.22 y 55 ppm de nitritos, como es la pechuga de pavo, este microorganismo alterante disminuiría su velocidad de crecimiento desde 0.403, a 0.234 y a 0.187 h⁻¹ conforme aumenta la concentración de cloruro sódico (0%, 1.2% y 2.4% respectivamente).

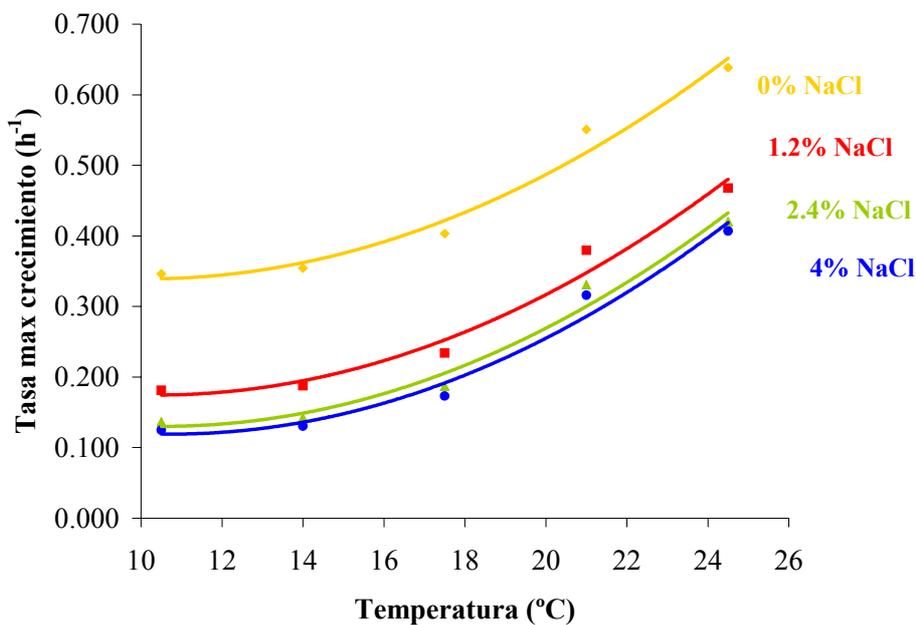


Figura 38. Evolución de la tasa máxima específica de crecimiento (h⁻¹) descritas por las bacterias ácido lácticas en pechuga de pollo envasado al vacío a diferentes temperaturas de almacenamiento.

La microbiología predictiva se muestra como una herramienta de trabajo útil para las nuevas formulaciones de productos puesto que se pueden realizar estimaciones del crecimiento de microorganismos alterantes de una forma rápida y sencilla, como es el ejemplo mostrado. Esta información nos permitirá controlar los parámetros que pueden influir en el crecimiento de microorganismos responsables de la alteración de los alimentos, con el fin de garantizar la vida comercial, evitando de esta forma grandes pérdidas económicas.

VI. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

PRIMERA. *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* fue identificado como el principal microorganismo responsable de la alteración de productos cárnicos cocidos envasados al vacío, por lo que fue seleccionado para la elaboración de los modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos.

SEGUNDA. Las variables consideradas en la elaboración de los modelos predictivos de crecimiento de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* en medio de cultivo ejercieron diferente influencia sobre el desarrollo del microorganismo. La temperatura fue el factor que ejerció un mayor efecto sobre la tasa máxima específica de crecimiento. Para la fase de adaptación, fueron determinantes la temperatura y concentración de cloruro sódico. Por último, la concentración de cloruro sódico y nitritos, y en menor grado el nivel de pH fueron los factores de mayor influencia sobre la densidad máxima de población. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el comportamiento de *L. mesenteroides* en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

TERCERA. Los índices sesgo (B_f) y exactitud (A_f) desarrollados por Ross se han mostrado como herramientas útiles para estimar la fiabilidad o bondad de ajuste de los modelos predictivos elaborados para *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*. En la elaboración de los **modelos** y en la **generalización o validación interna** se observaron valores B_f y A_f próximos a la unidad, tanto para los modelos de Respuesta en Superficie (RS) como los modelos de Redes Neuronales Artificiales (RN), en aerobiosis y anaerobiosis.

CUARTA. En la **validación matemática externa** con datos adicionales, en aerobiosis se observó que los modelos de RN individual fueron los que realizaron predicciones más exactas de los parámetros cinéticos tasa máxima de crecimiento y densidad máxima de población de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, mientras que para la fase de adaptación tanto el modelo de RN individual como el modelo de RS estimaron adecuadamente este parámetro. En anaerobiosis, los modelos de RN individual fueron los que mejor estimaron los tres parámetros cinéticos. Tanto en aerobiosis como en anaerobiosis los valores observados para los índices B_f y A_f fueron próximos a 1, variando entre 0.95-1.23 para el factor sesgo y entre 1.14 y 1.31 para el factor exactitud.

QUINTA. En la **validación realizada en los productos cárnicos cocidos** envasados al vacío, se observó que los modelos de RN, tanto individual como conjunto, proporcionaron estimaciones más exactas que el modelo de RS para los tres parámetros cinéticos. Sin embargo, para la tasa máxima de crecimiento los modelos realizan predicciones inferiores a las observadas y como consecuencia la vida comercial predictiva se alarga en comparación con la vida comercial observada sensorialmente. Este es un inconveniente desde el punto de vista económico y de prestigio para las empresas alimentarias, ya que los signos de alteración aparecerían antes de la fecha de consumo preferente estimada por los modelos.

SEXTA. En la **validación en jugo de los productos cárnicos cocidos** inoculado con *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, se observó tanto en aerobiosis como en anaerobiosis que el modelo de RS fue el que mejor estimó la fase de adaptación, mientras que los modelos de RN, individual y conjunto, fueron los que proporcionaron predicciones más exactas de la tasa máxima específica de crecimiento y densidad máxima de población, obteniéndose en todos los casos valores de B_f y A_f próximos a la unidad. Los modelos realizaron predicciones adecuadas desde el punto de vista sensorial, al predecir con anticipación la aparición de los signos de alteración en los alimentos.

SEPTIMA. Con el fin de simplificar la aplicación de los modelos predictivos en la industria alimentaria, se seleccionaron los modelos de RN individual, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, para la estimación de cada uno de los tres parámetros cinéticos de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, ya que los errores de estimación obtenidos en la elaboración del modelo y en la validación fueron mejores que los obtenidos con el modelo de RN conjunto y el modelo de RS.

OCTAVA. Los modelos seleccionados de RN individual se aplicaron de forma satisfactoria para predecir la vida comercial de los productos cárnicos, observándose una gran similitud entre la vida comercial observada y la vida comercial predictiva para un nivel de *L. mesenteroides* de $10^{6.5}$ ufc/g. Además, en este estudio se comprobó en un ejemplo práctico la utilidad de los modelos predictivos en la formulación de nuevos productos. Por todo ello, se ha demostrado que la Microbiología Predictiva es una útil herramienta que puede ser aplicada en el ámbito de la seguridad y calidad de la industria alimentaria.

VII. RESUMEN

7. RESUMEN

En este estudio se han elaborado modelos predictivos de crecimiento de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* a partir de medidas de absorbancia en Bioscreen C en función del efecto combinado de las variables temperatura (10.5- 24.5°C), nivel de pH (5.5- 7.5), concentración de cloruro sódico (0.25- 6.25%) y de nitrito sódico (0-200 ppm) bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis en caldo MRS. Los datos de crecimiento de *L. mesenteroides* obtenidos a partir de medidas de absorbancia fueron ajustados al modelo primario de Baranyi y Roberts, el cual proporcionó los principales parámetros cinéticos (tasa máxima específica de crecimiento, fase de adaptación y densidad máxima de población). La temperatura fue el factor que ejerció un mayor efecto sobre la tasa máxima específica de crecimiento. Para la fase de adaptación, fueron determinantes la temperatura y concentración de cloruro sódico. Por último, la concentración de cloruro sódico y nitritos, y en menor grado el nivel de pH fueron los factores de mayor influencia sobre la densidad máxima de población. Se observaron diferencias significativas en el comportamiento de *L. mesenteroides* en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

De los tres tipos de modelos aplicados a los datos, según la validación matemática, en aerobiosis se observó que el modelo de Redes Neuronales (RN) individual fue el que realizó predicciones más exactas de los parámetros cinéticos tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}) y densidad máxima de población (y_{End}) de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, mientras que para la fase de adaptación (λ) tanto el modelo de RN individual como el modelo de Respuesta en Superficie (RS) estimaron adecuadamente este parámetro. En anaerobiosis, el modelo de RN individual fue el que mejor estimó los parámetros λ , μ_{max} y y_{End} de dicho microorganismo. En ambas atmósferas gaseosas, los valores observados para los índices B_f y A_f fueron próximos a 1, variando entre 0.95-1.23 para el factor sesgo y entre 1.14 y 1.31 para el factor exactitud.

Para la validación realizada en los productos cárnicos cocidos envasados al vacío, con las bacterias ácido lácticas como parte de la microflora natural, se observó que los modelos de RN fueron los que proporcionaron estimaciones más exactas y

ajustadas que el resto de modelos para los tres parámetros cinéticos (λ , μ_{max} y y_{End}). Sin embargo, el valor $B_f < 1$ obtenido para la tasa máxima de crecimiento indica que el modelo realiza predicciones inferiores a las descritas en los productos cárnicos y por tanto la vida comercial estimada por los modelos será mayor que la observada.

En la validación en jugo de los productos cárnicos cocidos inoculado con *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, se observó en aerobiosis y anaerobiosis que el modelo de RS fue el que mejor estimó λ , mientras que los modelos de RN fueron los que proporcionaron predicciones más exactas de μ_{max} y de y_{End} . En todos los casos dichos modelos realizan predicciones adecuadas desde el punto de vista sensorial, al estimar un crecimiento microbiano más rápido y por tanto predecir con anticipación la aparición de los signos de alteración en los alimentos.

Para facilitar la aplicación de los modelos predictivos en la industria alimentaria, se seleccionaron los modelos de RN individual, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, para estimar los tres parámetros cinéticos. Esta elección se basó en el hecho de que los errores de estimación (*RMSE* y *SEP*) y los índices B_f y A_f obtenidos en la elaboración del modelo, generalización, validación matemática y validación en los productos y jugos cárnicos fueron más ajustados y exactos que los obtenidos con el resto de modelos.

Finalmente se comprobó que los modelos secundarios de crecimiento elaborados para *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* son una herramienta útil para calcular la vida media comercial predictiva de los productos cárnicos cocidos, empleando los parámetros cinéticos estimados por dichos modelos matemáticos. Los modelos de RN individual y conjunta fueron los que estimaron unos tiempos de vida comercial más aproximados a los observados en los productos cárnicos para un nivel de *L. mesenteroides* de $10^{6.5}$ ufc/g.

VIII. SUMMARY

8. SUMMARY

In this study, predictive growth models have been developed for *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* based on absorbance measurements in Bioscreen C and combined effect of variables temperature (10.5- 24.5°C), pH level (5.5- 7.5), sodium chloride concentration (0.25- 6.25%) and sodium nitrite (0-200 ppm), in aerobiosis and anaerobiosis conditions, using MRS broth. Growth data of *L. mesenteroides* were fitted to primary model of Baranyi and Roberts, which provided the main kinetic growth parameters (maximum specific growth rate, lag phase and maximum population density). The temperature was the most important factor to determine the maximum specific growth rate (μ_{max}), while the lag phase (λ) was mostly influenced by temperature and sodium chloride concentration. Finally, sodium chloride and nitrite concentrations, and secondly, pH level were the more influential factors on the maximum population density (y_{End}). There were significant differences between aerobic and anaerobic atmospheres for growth of *L. mesenteroides*.

For mathematical validation, in aerobiosis it was observed that the individual Artificial Neural Network (ANN) model showed more accurate predictions for the kinetic parameters μ_{max} and y_{End} of *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, while for λ both models, individual ANN and Response Surface (RS) models predicted appropriately this parameter. In anaerobiosis, the individual ANN model was the best model to estimate the growth parameters λ , μ_{max} and y_{End} for that microorganisms. In both gaseous atmospheres, the observed values for Bias (B_f) and Accuracy (A_f) factors were nearly 1, between $B_f = 0.95- 1.23$ and $A_f = 1.14- 1.31$.

For the validation on vacuum packed cooked meat products, with lactic acid bacteria being part of the natural microflora, it was observed that individual and combined ANN models provided better adjustment than others models for three kinetic parameters (λ , μ_{max} and y_{End}). However, $B_f < 1$ obtained for the maximum specific growth rate, indicates that the model provide predictions less than observations on meat products, so predicted shelf life will be larger than observed shelf life.

For the validation on meat products juice inoculated with *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, in aerobiosis and anaerobiosis the Response Surface model predicted more exactly the parameter λ , while with individual and combined ANN models it obtained more accurate predictions for μ_{max} and y_{End} . All models carry out adequate predictions from a sensorial point of view, because they estimate a microbial growth faster than observed growth, and they predict the appearance of spoilage in food in advance.

So as to facilitate the application of predictive models in the food industry, individual ANN models were selected in aerobiosis and anaerobiosis, to estimate the three kinetic parameters. This election is based on the estimation errors (*RMSE* and *SEP*) and B_f and A_f factors for model, internal validation, mathematical validation and validation on meat products and juice were more accurate than values obtained with other models.

Finally, it was proved that secondary growth models for *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* are a useful tool to calculate shelf life of cooked meat products, using the estimated kinetic parameters by this mathematical models. Individual and combined ANN models predicted shelf life times more approximate to observed times in cooked meat products for a level of *L. mesenteroides* of $10^{6.5}$ cfu/ g.

IX. BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

- Adair, C. y Briggs, P.A. 1993. The concept and application of expert systems in the field of microbiological safety. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 236-267.
- Adair, C., Kilsby, D. y Whittall P. 1989. Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the square root model for predicting bacterial growth in foods. *Food Microbiol.*, 6, 7-18.
- Adams, M.R., Little, C.L. y Easter, M.C. 1991. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 65-71.
- Aggelis, G., Samelis, J., y Metaxopoulos, J., 1998. A novel modelling approach for predicting microbial growth in a raw cured meat product stored at 3° C and at 12° C in air. *Int. J. Food Microbiol.*, 43, 39-52.
- Ahvenainen, R., Kivikataja, R.L. y Skitta, E. 1990. Factors affecting the shelf life of gas and vacuum-packaged cooked meat products. Part II: Vienna sausages. *Lebensm. Wiss. Technol.* 23, 130-138.
- Alber, S.A. y Schaffner, D.W. 1992. Evaluation of data transformations used with the square root and Schoolfield models for predicting bacterial growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3337-3343.
- Alm, F., Erichsen, I. y Molin, N. 1961. The effect of vacuum-packaging on some sliced processed meat products as judged by organoleptic and bacteriological analysis. *Food Technol.* 15, 199-203.
- Ambrosiadis, J. y Georgakis, S. 1993. *Fleischwirtsch.* 73, 952.
- Andersen, F. 1989 Shelf-life of vacuum packed bologna type sausage as affected by oxygen permeability, initial count and storage temperature. Proceedings of the 34th International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen, 400-402.
- Anifantaki, K., Metaxopoulos, J., Kammenou, M., Drosinos, E. H. y Vlassi, M. 2002. The effect of smoking, packaging and storage temperature on the bacterial greening of frankfurters caused by *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*. *Ital. J. Food Science*, 2, 135-143.
- Anzaldúa-Morales, A. 1994. La evolución sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Acribia, Zaragoza, España.
- Anzaldúa-Morales, A., Garza, D., Pérez-Vargas, C. y Pico, L. 1987. Resultados de pruebas de evaluación sensorial. Reporte interno. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Químicas., División de Estudios de Postgrado. Chihuahua, Chih. México.
- Anzaldúa-Morales, A., Lever, C. y Vermon, E. 1983. Nuevos métodos de evaluación sensorial y su aplicación en reología y textura. *Tecnología Alimentaria*, 18, 4.
- Arinder, P. y Borch, E. 1999. Validation of mathematical models for predicting growth of *Pseudomonas spp.* Predictive microbiology applied to chilled food preservation. En: *Refrigeration Science and Technology Proceedings*. 185-193.
- Armas, A.D., Wynne, A. y Sutherland, J.P. 1996. Validation of predictive models using independently published data. Poster/Abstract 2nd International Conference of Predictive Microbiology, Hobart, Australia.
- Armstrong, G.A. y McIlveen, H. 2000. Effect of prolonged storage on the sensory quality and consumer acceptance of sous vide meat-based recipe dishes. *Food Quality and Preference*, 11, 377-385.
- Arrhenius, S. 1889. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Z. Phys. Chem.* 4, 226-248.
- Auerswald, H., Peters, P., Brückner, B., Krumbein, A. y Kuchenbuch, R. 1999. Sensory analysis and instrumental measurements of short-term stored tomatoes. (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Postharvest Biology and Technology*, 15, 323-334.

- Aulik, J.L. 1994. Lactic acid bacteria of poultry products. Dissertation Abstracts International.-B; 55, 1239. Order n° DA9418561, 227 pp.
- Banks, J.G. 1994. Process control and quality assurance through the application of HACCP and predictive microbiology. En: Minimal processing of foods and process optimisation. An interface, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 191-199.
- Bañón, S., Costa, E., Gil, M. y Garrido, M. 2002. A comparative study of boar taint in cooked and dry-cured meat. Meat Sci., In press.
- Barakat, R.K. y Harris, L.J. 1999. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cooked modified-atmosphere-packaged poultry in the presence and absence of a naturally occurring microbiota. Appl. Environm. Microbiol., 65, 342-345.
- Baranyi, J. 1992. Letters to the Editor: a note on reparameterization of bacterial growth curves. Food Microbiol., 9, 169-171.
- Baranyi, J. 1997. Simple is good as long as it is enough. Food Microbiol., 14, 189-192.
- Baranyi, J. y Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiol., 23, 277-294.
- Baranyi, J. y Roberts, T.A. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. Int. J. Food Microbiol., 26, 199-218.
- Baranyi, J., McClure, P.J., Sutherland, J.P. y Roberts, T.A. 1993b. Modeling bacterial growth responses. J. Ind. Microbiol., 13, 190-194.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. y McClure, P.J. 1993a. A nonautonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiol., 10, 43-59.
- Baranyi, T., Robinson, T.P., Kaloti, A. y Mackey, B.M. 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. Int. J. Food Microbiol., 27, 61-75.
- Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T.A. y Roberts, T.A. 1996. Effects of parameterisation on the performance of empirical models used in predictive microbiology. Food Microbiol., 13, 83-91.
- Barbosa-Canovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E. y Swanson, B.G. 1998. Emerging technologies in food preservation. En: Nonthermal preservation of foods. Marcel Dekker, New York, pp. 1-8.
- Barco, E. 2001. Tesis Doctoral. Elaboración de modelos predictivos de crecimiento microbiano para *Escherichia coli* O157:H7. Validación en productos cárnicos cocidos envasados al vacío. Universidad de Córdoba.
- Barco Alcalá, E., García Gimeno R.M^a, Castillejo Rodríguez A.M^a y Zurera Cosano, G. 2000. La turbidimetría como método rápido para la determinación de microorganismos presentes en los alimentos. Alimentaria, pp. 109-112.
- Basheer, I. y Hajmeer, M. 2000. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design and application. J. Microbiological Methods, 43, 3-31.
- Bazin, M.J. y Prosser, J.I. 1992. Modelling microbial ecosystems. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl., 73, 89S-95S.
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C. y Lebert, A. 1996. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. J. Microbiol. Methods, 25, 225-232.
- Begot, C., Lebert, I. y Lebert, A. 1997. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. Food Microbiol., 14, 403-412.
- Belehradek, J. 1930. Temperature coefficients in biology. Biol. Rev. Biol. Proc. Camb. Phil. Soc., 5, 30-60.
- Bello, J. y Sanchez-Fuertes, M.A. 1995. Application of a mathematical model to describe the behaviour of *Lactobacillus spp.* during the ripening of Spanish dry fermented sausage (Chorizo). Int. J. Food Microbiol., 27, 215-227.
- Bennik, M., Smid, E., Rombouts, F. y Gorris, L. 1995. Growth of psychrotrophic foodborne pathogens in a solid surface model system under the influence of

- carbon dioxide and oxygen. Food Microbiol., 12, 509-519.
- Bersani, C., Bregoli, M. y Cantoni, C. 1999. Spoilage of vacuum packaged beef: role of lactobacilli spp. *Industri Alimentari*, 38, 654-656.
- Bersani, C., Cantoni, C. y Aubert, Sd. 1991. Observations on coagulase-negative staphylococci present in raw ripened sausages. *Industrie Alimentari*, 30, 12-14.
- Betts, G. y Earnshaw, R. 1998. Predictive microbiology for evaluating food quality and safety. *Food Review*, 25, 11-13.
- Beumer, R.R., Giffel, M.C., de Boer, E. y Rombouts F.M. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. *Food Microbiol.*, 13, 333-340.
- Bille, J. 1989. Anatomy of a foodborne listeriosis outbreak. In: Foodborne listeriosis. E. H. Kampelmacher (ed), Behr's Verlag GmbH., Wiesbaden, Germany, 29-36.
- Björkroth, J. y Korkeala, H. 1996a. Evaluation of *Lactobacillus sake* contamination in vacuum-packaged sliced cooked meat product by ribotyping. *Journal Food Prot.* 59, 398-401.
- Björkroth, J. y Korkeala, H. 1996b. RNA gene restriction patterns as a characterization tool for *Lactobacillus sake* strains producing ropy slime. *Int. J. Food Microbiol.*, 30, 293-302.
- Björkroth, K.J., Vandamme, P. y Korkeala, H.J. 1998. Identification and characterisation of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Appl. Environm. Microbiol.*, 64, 3313-3319.
- Blanco, D., Barbier, G., Mambriani, P., Spotti, E. y Barbuti, S. 1994. Study of the "potato defect" of raw dry-cured ham. *Industria Conserve*, 69, 230-236.
- Blickstad, E. 1983. Growth and end product formation of two psychrotrophic *Lactobacillus spp.* and *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509^T at different pH values and temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1345-1350.
- Blickstad, E. y Molin, G. 1984. Growth and end-product formation in fermenter cultures of *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509 and two psychrotrophic *Lactobacillus spp.* in different gaseous atmospheres. *J. Appl. Bacteriol.*, 57, 213-220.
- Bloukas, J.G., Paneras, E.D. y Fournitzis, G.C. 1997. Sodium lactate and protective culture effects on quality characteristics and shelf life of low-fat frankfurters produced with olive oil. *Meat Sci.*, 45, 223-238.
- Borch, E. y Molin, G. 1988. Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek*, 54, 301-323.
- Borch, E. y Molin, G. 1989. The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix* and *Carnobacterium* in batch cultures. *Appl. Microbiology and Biotechnology*. 30, 81-88.
- Borch, E. y Nerbrink, E. 1989. Shelf-life of emulsion sausage stored in vacuum or modified atmospheres. *Proceedings of the 34th International Congress of Meat Science and Technology*, Copenhagen, 470-477.
- Borch, E., Kant-Muermans, M.L. y Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 33, 103-120.
- Borch, E., Nerbrink, E. y Svensson, P. 1988. Identification of major contamination sources during processing of emulsion sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 7, 317-330.
- Bredholt, S., Nesbakken, T. y Holck, A. 2001. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *Int. J. Food Microbiol.*, 66, 191-196.
- Breidt, F. y Fleming, H.P. 1998. Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Appl. Environm. Microbiol.*, 64, 3159-3165.
- Breidt, F. y Fleming, H.P. 1999. A theoretical model for the competitive growth of bacteria on food surfaces. In: *Food Microbiology and Food Safety into the next Millenium*, proceedings of the

- Seventeenth International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH), Veldhoven, The Netherlands, 13-17, 889-890.
- Brennan, J.G., Butters, J.R. y Cowell, N.D. 1990. Heat processing 2. En: Food Engineering Operations. Elsevier, UK, pp. 297-301.
- Brewer, M.S., Mc Keith, F.K. y Sprouls, G. 1993. Sodium lactate effects on microbial, sensory and physical characteristics of vacuum-packaged pork sausages. *J. Muscle Foods*, 4, 179-192.
- Brondum, J., Byrne, D.V., Back, L.S., Bertelsen, G. y Engelsen, S.B. 2000. Warmed-over flavour in porcine meat a combined spectroscopic, sensory and chemometric study. *Meat Sci.*, 54, 83-95.
- Broughall, J.M., Anslow, P.A. y Kilsby, D.C. 1983. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: Development of mathematical models describing the effect of water activity. *J. Appl. Bacteriol.*, 55, 101-110.
- Bruna, J., Hierro, E., De la Hoz, L., Mottram, D., Fernández, M. y Ordóñez, J. 2001. The contribution of *Penicillium aurantiogriseum* to the volatile composition and sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Sci.* 59, 97-107.
- Buchanan, R.L. 1991. Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. *J. Food Saf.*, 11, 123-134.
- Buchanan, R.L. 1993a. Predictive food microbiology. *Trends Food Sci. Technol.*, 4, 6-11.
- Buchanan, R.L. 1993b. Developing and distributing user friendly application software. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 251-255.
- Buchanan, R.L. 1995. The role of microbiological criteria and risk assessment in HACCP. *Food Microbiol.*, 12, 421-424.
- Buchanan, R.L. y Bagi, L.K. 1994. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 317-332.
- Buchanan, R.L. y Bagi, L.K. 1997. Effect of water activity and humectant identity on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157: H7. *Food Microbiol.*, 14, 413-423.
- Buchanan, R.L. y Cygnarowicz, M.L. 1990. A mathematical approach towards defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiol.*, 7, 237-240.
- Buchanan, R.L. y Klawitter, L.A. 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 12, 235-246.
- Buchanan, R.L. y Klawitter, L.A. 1992. The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.*, 9, 185-196.
- Buchanan, R.L. y Whiting, R.C. 1996. Risk assessment and predictive microbiology. *J. Food Prot.*, 59, 31-36.
- Buchanan, R.L. y Whiting, R.C. 1997. Concepts in predictive microbiology. En: Reciprocal Meat Conference Proceedings. 50, American Meat Science Association, Kansas, pp. 93-97.
- Buchanan, R.L., Bagi, L.K., Goins, R.V. y Phillips, J.G. 1993a. Response surface models for the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 10, 303-315.
- Buchanan, R.L., Smith, J.L., McColgan, C., Marmer, B.S., Golden, M. y Dell, B. 1993b. Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride, and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *J. Food Saf.*, 13, 159-175.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., y Damert, W.C. 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiol.*, 14, 313-326.
- Byrne, D.V., Bredie, W.L., Bak, L.S., Bertelsen, G., Martens, H. y Martens, M. 2001. Sensory and chemical analysis of cooked porcine meat patties in relation to warmed-over flavour and preaslaughter stress. *Meat Sci.*, 59, 229-249.
- Candek-Potokar, M., Zlender, B. y Monin, G. 2002. Pork quality, processing and sensory characteristics of dry-cured hams as

- influenced by Duroc crossing and sex. *J. Animal Sci.*, 80, 988-996.
- Cantoni, C., Bersani, C., Rosa, M. y D'Aubert, S. 1992. Origin and causes of discoloration of bresaola. *Ingegneria Alimentare le Conserve Anamali*, 8, 20-23.
- Cassin, M.H., Lammerding, A.M., Ewen, T. C. D., Ross, W. y McColl, R. S. 1998. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int. J. Food Microbiol.*, 41, 21-44.
- Castillejo, A. 2002. Tesis Doctoral: Elaboración de modelos predictivos de crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus*. Validación en productos cárnicos envasados al vacío. Universidad de Córdoba.
- Castillejo-Rodríguez, A.M., Barco-Alcalá E., García-Gimeno, R.M. y Zurera-Cosano, G. 2000. Growth modelling of *Listeria monocytogenes* in packaged fresh green asparagus. *Food Microbiol.*, 17, 421-427.
- Castillejo-Rodríguez, A.M., García-Gimeno, R.M., Zurera-Cosano, G., Barco-Alcalá, E. y Rodríguez-Pérez, M.R. 2002. Assessment of mathematical models for predicting *Staphylococcus aureus* growth in cooked meat products. *J. Food Prot.*, 65, 659-665.
- Cegielska-Radziejewska, R. y Pikul, J. 2000. Modified atmosphere packaging as a way of prolonging shelf-life of sliced poultry sausages stored in refrigerated conditions. *Chlodnictwo*, 35, 37-41.
- Cegielska-Radziejewska, R. y Pikul, J. 2001. Effect of gas atmosphere, storage temperature and time on the quality and shelf-life of sliced poultry sausage. *Archiv fuer Gefluegelkunde*. 65, 274-280.
- Champagne, C.P. y Gardner, N.J. 2002. Effect of process parameters on the production and drying of *Leuconostoc mesenteroides* cultures. *J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.*, 28, 291-296.
- Chandler, R.E. y McMeekin, T.A. 1985a. Temperature function integration and the prediction of the shelf-life of milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, 40, 10-13.
- Chandler, R.E. y McMeekin, T.A. 1985b. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurised homogenised milk. *Aust. J. Dairy Technol.*, 40, 37-41.
- Chandler, R.E. y McMeekin, T.A. 1989a. Modelling the growth response of *Staphylococcus xylosus* to changes in temperature and glycerol concentration/water activity. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 543-548.
- Chandler, R.E. y McMeekin, T.A. 1989b. Combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Halobacterium spp.* *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 71-76.
- Chapman, K.W., Lawless, H.T. y Boor, K.J. 2001. Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk. *J. Dairy Sci.*, 84, 12-20.
- Civille, G. y Szczesniak, A. 1973. Guidelines to training a texture profile panel. *Journal of Texture Studies*, 4, 204.
- Cole, M.B. 1991. Opinion: predictive microbiology- yet it is! *Lett. Appl. Microbiol.*, 13, 218-219.
- Cole, M.B., Franklin, J.G. y Keenan, M.H. 1987. Probability of growth of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in a model fruit drink system. *Food Microbiol.*, 4, 115-119.
- Cole, M.B., McClure, P.J., Stephens, P.J. y Davies, K.W. 1994. Model validation (and confidence in models) – an industry perspective. Abstract 102, 81st Annual Meeting of IAMFES, San Antonio, TX, USA.
- Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Catálogo de cepas. 1998. 4ª Edición. Editores: C. Belloch, L. López, B. Esteve, P.V. Martínez, M.D. Gª-López y F. Uruburu. Universidad de Valencia, España, pp. 50.
- Coleman, M.E., Tampli, M.L., Phillips, J.G. y Marmer, B.S. 2003. Influence of agitation, inoculum density, pH, and strain on the growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7-relevance to risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.*, 83, 147-160.
- Collins-Thompson, D.L. y Rodríguez López, G. 1980. Influence of sodium nitrite, temperature, and lactic acid bacteria on the growth of *Brochothrix thermosphacta* under

- anaerobic conditions. *Can. J. Microbiol.*, 26, 1416-1421.
- Collins-Thompson, D. y Rodríguez López, G. 1982. Control of *Brochothrix thermosphacta* by *Lactobacillus species* in vacuum packed bologna. *Can. Institute Food Science Technology*, 15, 307-309.
- Coronado, S.A., Trout G.R., Dunshea F.R. y Shah N.P. 2002. Antioxidant effects of rosemary extract and whey powder on the oxidative stability of wiener sausages during 10 months frozen storage. *Meat Sci.*, 62, 217-224.
- Costell, E. y Durán, L. 1981. El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos. III. Planificación, selección de jueces y diseño estadístico. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 21, 454.
- Coventry, M.J., Hickey, M.W., Mawson, R., Drew, P., Wan, J., Krause, D. y Boghossian, V. 1998. The comparative effects of nitrogen and oxygen on the microflora of beef steaks in carbondioxide-containing modified atmosphere vacuum skin-packaging (MA-VSP) systems. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, 427-431.
- Crehan, C.M., Troy, D.J. y Buckley, D.J. 2000. Effects of salt level and high hydrostatic pressure processing on frankfurters formulated with 1.5 and 2.5% salt. *Meat Sci.*, 55, 123-130.
- Cuppers, H.G. y Smelt, J.P. 1993. Time to turbidity measurement as a tool for modelling spoilage. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 168-171.
- Cuppers, H.G., Oomes, S. y Brul, S. 1997. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage moulds. *Appl. Environm. Microbiol.*, 63, 3764-3769.
- Dainty, R.H. 1982. Biochemistry of undesirable effects attributed to microbial growth on proteinaceous foods at chill temperatures. *Food Chem.* 9, 103-113.
- Dainty, R.H. y Hibbard, C.M. 1980. Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *J. Appl. Bacteriol.*, 48, 387-396.
- Dainty, R.H. y Mackey, B.M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol.*, 73, 103 S-114 S.
- Dainty, R.H., Shaw, B.G., Harding, C.D. y Michanie, S. 1979. The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. En: Russell and Fuller (Ed.). *Cold tolerant microbes in spoilage and environment*. Academic Press, London, pp. 223-230.
- Dalgaard, P. 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 26, 305-317.
- Dalgaard, P. 2000. Fresh and lightly preserved seafood. En: *Shelf life evaluation of foods*. 2nd Edition Man, C. M. D. and Jones, A. A. (Eds.). Aspen Publishing Inc. Maryland, pp. 110-139.
- Dalgaard P. y Jørgensen, L. V. 1998. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.*, 40, 105-115.
- Dalgaard, P. y Koustoumanis, K. 2001. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *J. Microbiol. Methods* 43, 183-196.
- Dalgaard, P. y Mejholm, O. 1996. Comparison of techniques for estimation of growth rates from turbidimetric measurements. 2nd International conference on predictive microbiology. 18-22 February Hobart, Tasmania, Australia.
- Dalgaard, P., Buch, P. y Silberg S. 2002. Seafood Spoilage Predictor—development and distribution of a product specific application software. *Int. J. Food Microbiol.*, 73, 343-349.
- Dalgaard, P., Mejlholm, O. y Huss, H. H. 1997. Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 38, 169-179.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. y McMeekin, T. A. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 391-404.

- Davey, K.R. 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 483-488.
- Davey, K.R. 1991. Applicability of the Davey linear Arrhenius predictive model to the lag phase of microbial growth. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 253-257.
- Davey, K.R. 1992. A terminology for models in predictive microbiology. *Food Microbiol.*, 9, 353-356.
- Davey, K.R. 1993. Linear-Arrhenius models for bacterial growth and death and vitamin denaturations. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 172-179.
- Davidson, P.M. y Juneja, V.K. 1990. Antimicrobial agents. En: *Food Additives*. A.L. Branen, P.M. Davidson and S. Salminen (eds), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 83-137.
- Davies, A.R. 1995. Advances in modified-atmosphere packaging. En: *New methods in food preservation*. G.W. Gould (ed), Blackie Academic & Professional, London, pp. 304-320.
- Davies, K.W. 1993. Design of experiments for predictive microbial modelling. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 295-300.
- Davies, A.R. y Slade, A. 1995. Fate of *Aeromonas* and *Yersinia* in modified-atmosphere-packaged (MAP) cod and trout. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 354-358.
- Day, B.P. 2000. Chilled storage of foods, Principles. En: *Encyclopedia of food Microbiology*. R.K. Robinson, C.A. Batt and P.D. Patel (eds), Academic Press, San Diego, pp. 403-410.
- De Anda- Serrano, A., Rubio- Lozano, M. S., Santillán- Valverde, M.C. y Méndez-Medina, D. 1999. Análisis descriptivo cuantitativo del jamón tipo "serrano" elaborado a partir del cerdo pelón mexicano. *Alimentaria*, octubre, 29-35.
- Devlieghere, F. 2000. Thesis. Predictive modelling of the spoilage and the microbial safety of modified atmosphere packaged cooked meat products. Universiteit Gent.
- Devlieghere, F., Debevere, J. y Van Impe, J. 1998. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.*, 41, 231-238.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Bernaert, H., Van Impe, J.F. y Debevere, J. 2000. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *Int. J. Food Microbiol.*, 58, 93-106.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Van De Waetere, B., Van Impe, J. y Debevere, J. 2001. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiol.*, 18, 53-66.
- Devlieghere, F. Van Belle, B. y Debevere, J. 1999. Shelf life of modified atmosphere packaged cooked meat products: a predictive model. *Int. J. Food Microbiol.*, 46, 57-70.
- de Wit, J.C. y Rombouts, F.M. 1990. Antimicrobial activity of sodium lactate. *Food Microbiol.*, 7, 113-120.
- Di Natale, C., Paolesse, R., Macagnano, A., Mantini, A., D'Amico, A., Legin, A., Lvova, L., Rudnitskaya A. y Vlasov, Y. 2000. Electronic nose and electronic tongue integration for improved classification of clinical and food samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 64, 15-21.
- Dixon, N.M. y Kell, D.B. 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 109-136.
- DoBmann, M.U., Vogel, R.F. y Hammes, W.P. 1996. Mathematical description of the growth of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus pentosus* under conditions prevailing in fermented sausages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 334-339.
- Dodds, K.L. 1993. *Clostridium botulinum* in foods. En: *Clostridium botulinum: ecology and controls in Foods*. A.H.W. Hausschild and K.L. Doods (eds), Marcel Dekker, New York, 53-68.
- Draper, N.R. 1988. Response surface designs. En: *Encyclopaedia of Statistical Sciences*, Wiley, New York, pp. 107-119.
- Draper, N. R. y Smith, H. 1981. *Applied Regression Analysis*, 2nd edn. New York: John Wiley.

- Duffy, L.L., Vanderline, P. B., y Grau, F. H. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 377-390.
- Duh, Y.H. y Schaffner, D.W. 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 56, 205-210.
- Dykes, G.A. y von Holy, A. 1993. Taxonomy of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged vienna sausages by total soluble protein profiles. *J. Basics Microbiol.*, 3, 169-177.
- Dykes, G.A. y von Holy, A. 1994. Taxonomic status of atypical *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* strains associated with vacuum-packaged meat spoilage. *Curr. Microbiology*, 28,197-200.
- Dykes, G.A., Britz,T.J. y von Holy, A. 1994a. Numerical taxonomy and identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged vienna sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 246-252.
- Dykes, G.A, Cloete, T.E. y von Holy, A. 1991. Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum packaged, smoked Vienna sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 13, 239-248.
- Dykes, G.A., Cloete, T.E. y von Holy, A. 1994b. Identification of *Leuconostoc species* associated with the spoilage of vacuum-packaged Vienna sausages by DNA-DNA hybridization. *Food Microbiol.*, 11, 271-274.
- Dykes, G.A, Cloete, T.E. y von Holy, A. 1995. Taxonomy of lactic acid bacteria associated with vacuum- packaged processed meat spoilage by multivariate analysis of cellular fatty acids. *Int. J. Food Microbiol.*, 28, 89-100.
- Egan, A. 1983. Lactic acid bacteria of meat products. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49, 327-336.
- Egan, A. y Shay, B. 1982. Significance of lactobacilli and film permeability in the spoilage of vacuum-packed beef. *J. Food Sci.* 47, 1119-1122, 1126.
- Egan, A.F., Eustace, I.J. y Shay, B.J. 1988. Meat packaging. Maintaining the quality and prolonging the storage life of chilled beef, pork and lamb. En: *Meat 88, Proceedings Industry Day, 34th International Congress of Meat Science and Technology*. Brisbane, pp. 68-75.
- Eifert, J., Gennings, C., Hans Carter, W. Jr., Duncan, S. y Hackney, C. 1996. Predictive model with improved statistical analysis of interactive factors affecting the growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *J. Food Prot.* 59: 608-614.
- Einarsson, H. 1994. Evaluation of a predictive model for the shelf life of cod (*Gadus morhua*) fillets stored in two different atmospheres at varying temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 93-102.
- Einarsson, H. y Ericksson, S.G. 1986. Microbial growth models for prediction of shelf life of chilled meat. *Recent Advances and Developments in the Refrigeration of Meat by Chilling* International Institute of Refrigeration. Paris, France, pp. 397-402.
- Elliot, P.H.1996. Predictive microbiology and HACCP. *J. Food Prot.*, 59, 48-53.
- Farber, J.M. 1991. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology-a review. *J. Food Prot.* 54, 58-70.
- Farber, J.M., Cai, Y. y Ross, W.H. 1996. Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *Int. J. Food Microbiol.*, 32, 133-144.
- Farkas, J. y Mohácsi-Farkas, 1998. Use of Impedimetry, Automated Turbidimetry and Luminometry to Study Microbial Growth. En: *COST 914. Predictive modelling of microbial growth and survival in foods*. Luxemburgo. Oficina de publicaciones oficiales de la Comunidad Europea,1999, pp. 281-291.
- Fernández, P.S. y Peck, M.W. 1997. Predictive model describing the effect of prolonged heating at 70°C to 80°C and incubation at refrigerated temperatures on growth and toxigenesis by nonproteolytic *Clostridium botulinum*. *J. Food Prot.* 60, 1064-1071.
- Fernandez, P.S., George, S.M., Sills, C.C. y Peck, M.W. 1997. Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on

- the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 37, 37-45.
- Fernández-Fernández, E., Vázquez-Odériz, M.L. y Romero Rodríguez, M.A. 2002. Sensory characteristic of Galician chorizo sausage packed under vacuum and under modified atmospheres. Meat Sci., 62, 67-71.
- Foegeding, P.M. 1997. Driving predictive modelling on a risk assessment path for enhanced food safety. Int. J. Food Microbiol., 36, 87-95.
- Frye, D.M., Zweig, R., Sturgeon, J., Tormey, M., LeCavalier, M., Lee, I., Lawani, L., Mascola, L. 2002. An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Delicatessen Meat Contaminated with *Listeria monocytogenes*. Clin. Infect. Dis., 35, 943-949.
- Fu, B., Taoukis, P.S. y Labuza, T.P. 1991. Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy products with time-temperature integrators. J. Food Sci., 56, 1209-1215.
- García, T., Martín, R., Sanz, B. y Hernández, P.E. 1995. Revisión: Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 35, 1-18.
- García de Fernando G., Nychas G., Peck M. y Ordoñez J. 1995. Growth/ Survival of psychrotrophic pathogen on meat packaged under modified atmospheres. Int. J. Food Microbiol., 28, 221-231.
- García-Gimeno, R.M^a y Zurera-Cosano, G. 1997. Determination of ready- to- eat vegetable salad shelf- life. Int. J. Food Microbiol., 36, 31-38.
- García-Gimeno, R.M^a, Castillejo-Rodríguez, A.M^a, Barco-Alcalá, E. y Zurera-Cosano, G. 1998. Determination of packaged green asparagus shelf- life. Food Microbiol., 15, 191-198.
- García-Gimeno, R.M^a, Hervás-Martínez, C. y de Silóniz, M^aI. 2002. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. Int. J. Food Microbiol., 72, 19-30.
- Gardner, G. 1966. A selective medium for the enumeration of *Microbacterium thermosphactum* in meat and meat products. J. Appl. Bacteriol. 29, 455-460.
- Garg, N., Curey, J. y Splittstoesser, D. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. J. Food Prot., 33, 701-703.
- Garriga, M., Marcer, M. y Hugas, M. 1996. Microbiología de la carne fresca y productos cárnicos envasados. Eurocarne, 49, 69-73.
- Garthright, W.E. 1997. The three-phase linear model of bacterial growth: a response. Food Microbiol., 14, 193-195.
- Garza, S., Ibarz, A., Pagan, J. y Giner, J. 1999. Non- enzymatic browning in peach puree during heating. Food Research Int., 32, 335-343.
- Geeraerd, A., Herremans, C., Cenens, C. y Van Impe J. 1998. Applications of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled food products. Int. J. Food Microbiol., 44, 49-68.
- Giannuzzi, L., Pinotti, A., Zaritzky, N. 1998. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. Int. J. Food Microbiol., 39, 101-110.
- Gibbs, P.A. y Williams, A.P. 1990. En: Using Mathematics for shelf life prediction. Food Technol. Int. Europe, pp. 287-290.
- Gibson, A.M. y Hocking, A.D. 1997. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. Trends Food Sci. Technol., 8, 353-358.
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J. y Roberts, T.A. 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. Int. J. Food Microbiol., 23, 419-431.
- Gibson, A., Bratchell, N. y Roberts, T. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. J. Appl. Bacteriol. 62, 479-490.
- Gibson, A., Bratchell, N. y Roberts, T. 1988. Predicting microbial growth : growth responses of salmonellae in a laboratory

- medium affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 155-178.
- Gill, C.O. 1982. Microbial interaction with meats. En: Brown, M. H. (Ed.). *Meat Microbiology*, Applied Science Publishers, London, New York, pp. 225-264.
- Gill, C.O. 1985. Prevention of early spoilage of livers. *Proc. Eur. Mtg. Meat Research Workers Conf. Bristol* 30, 14.
- Gill, C.O. y Badoni, M. 2002. Microbiological and organoleptic qualities of vacuum-packaged ground beef prepared from pasteurized manufacturing beef. *Int. J. Food Microbiol.*, 74, 111-118.
- Gill, C.O. y Holley R. A. 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research Int.*, 33, 83-90.
- Gill, C.O. y Jones, T. 1992. Assessment of the hygienic efficiency of two commercial processes for cooling pig carcasses. *Food Microbiol.*, 9, 335-343.
- Gill, C.O., Harrison, J.C. y Phillips, D.M. 1991a. Use of temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process. *Food Microbiol.*, 8, 83-94.
- Gill, C.O., Jones, S.D. y Tong, A.K. 1991b. Application of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a process for spray chilling beef carcasses. *J. Food Prot.*, 54, 731-736.
- Gobat, P.F. y Jemmi, T. 1993. Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready-to-eat fish and meat products in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.*, 20, 117-120.
- Goldblith, S.A., Joslyn, M.A. y Nickerson, J.T. 1961. An introduction to the thermal processing of foods, vol. 1, p. 1128. AVI Publishing Co., Westport, Conn.
- Goodburn, K.E. y Halligan, A.C. 1988. *Modified-Atmosphere Packaging: A technology guide*. Leatherhead Food RA, Leatherhead.
- Goutefongea, R. 1992. Salting and curing. En: *Technology of meat products*. J.P. Girard (ed), Ellis Horwood, New York, pp. 115-137.
- Graham, A.F., Mason, D.R. y Peck, M.W. 1996. Predictive model of the effect of temperature, pH and sodium chloride on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Int. J. Food Microbiol.*, 31, 69-85.
- Grant, G.F., McCurdy, A.R. y Osborne, A.D. 1988. Bacterial greening in cured meats : A review. *An. Inst. Food Science Technology*. 21, 50-56.
- Grau, F.H. y Vanderline, P.B. 1993. Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: equations describing the effects of temperature and pH. *J. Food Prot.*, 56, 96-101.
- Griffiths, M.W. y Phillips, J.D. 1988. Prediction of the shelf life of pasteurised milk at different storage temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, 65, 269-278.
- Guerrero, L. 1995. Métodos descriptivos del análisis sensorial. (I). Métodos clásicos de obtención de perfiles. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, diciembre, 41-46.
- Hajmeer, M., Basheer, I. y Najjar, Y. 1997. Computational neural networks for predictive microbiology II. Application to microbial growth. *Int. J. Food Microbiol.*, 34, 51-66.
- Hassibi, B. y Storck, D. 1993. Second-order derivatives for network pruning: optimal brain surgeon. En: *Advances in Neural Information Processing (NIPS-5)* vol. 5. S. Hanson, S. Cowan and C.L. Giles, Editors. Morgan Kaufmann, San Mateo, CA, pp. 164-171.
- Haugen, J.E. 2001. Electronic noses in food analysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 488, 43-57.
- Hauschild, A.H. 1982. Assessment of botulism hazards from cured meat products. *Food Technol.*, 36, 95-104.
- Hayes P.R. 1985. *Food Microbiology and Hygiene*. Elsevier, London, pp. 80-139.
- Haykin, S. 1994. *Neural Networks. A Comprehensive Foundation*. Macmillan College Publishing Company, New York.
- Hervás, C., Algar, J. y Silva, M. 2000. Correction for temperature variations in kinetic- based determinations with pruning computational neural networks by using

- genetic algorithms. *J. Chem. Inform. Comp. Sci.*, 40, 724-731.
- Hervás, C., Toledo, R. y Silva, M. 2001a. Use of pruned computational neural networks for processing the response of oscillating chemical reaction with a view to analyzing nonlinear multicomponent mixtures. *J. Chem. Inform. Comp. Sci.*, 41, 1083-1092.
- Hervás, C., Zurera, G., García, R.M. y Martínez, J. 2001b. Optimization of computational neural network for its application to the prediction of microbial growth in foods. *Food Sci. Technol. Int.*, 7, 159-163.
- Holley, R. 1997a. Asymmetric distribution and growth of bacteria in sliced vacuum-packaged ham and Bologna. *J. Food Prot.*, 60, 510-519.
- Holley, R. 1997b. Impact of slicing hygiene upon shelf life and distribution of spoilage bacteria in vacuum packaged cured meats. *Food Microbiol.*, 14, 201-211.
- Holley, R. y McKellar, R. 1996. Influence of unsliced delicatessen meat freshness meat upon bacterial growth in subsequently prepared vacuum packed slices. *Int. J. Food Microbiol.*, 29, 297-309.
- Holley, R., Lamoureux, M. y Dussault, F. 1996. Identification of lactic spoilage bacteria from vacuum-packed cooked luncheon meat and induction of repairable injury by mild thermal stress. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 29, 114-122.
- Holzappel, W.H. 1992. Culture media for non-sporulating Gram-positive food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 17, 113-133.
- Holzappel, W.H. 1998. The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. En: *Microbiology of meat and poultry*. A. Davies and R. Board (eds), Blackie Academic & Professional, pp. 35-84.
- Holzappel, W.H. y Gerber, E.S. 1986. Predominance of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake* in the spoilage association of vacuum-packaged meat-products. Abstracts of the 32nd European Meeting of Meat Research Workers, Ghent, 26.
- Houtsma, P.C., de Wit, J.C. y Rombouts, F.M. 1993. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms in meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 20, 247-257.
- Houtsma, P.C., de Wit, J.C. y Rombouts, F.M. 1996. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate and sodium chloride for spoilage organisms and pathogens at different pH values and temperatures. *J. Food Prot.* 59, 1300-1304.
- Houtsma, P.C., Kusters, B.J., de Wit, J.C., Rombouts, F.M. y Zwietering, M.H. 1994. Modelling growth rates of *Listeria innocua* as a function of lactate concentration. *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 113-123.
- Hudson, J.A. 1993. Effect of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. *Lett. Applied Microbiology*. 16, 274-276.
- Hudson, J.A. y De Lacy, K.M. 1991. Incidence of motile Aeromonads in New Zealand retail foods. *J. Food Prot.*, 54, 696-699.
- Hudson, J.A. y Mott, S.J. 1993. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cooked beef under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiol.*, 10, 429-437.
- Huis in't Veld, J. H. J. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int. J. Food Microbiol.*, 33, 1-18.
- Hunter, P.R., Cooper-Poole, B. y Hornby, H. 1992. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from cooked tripe. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 111-223.
- Ibáñez, F.C. y Barcina, Y. 2001. Análisis sensorial de alimentos. Métodos y aplicaciones. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, España.
- ICMSF. 1982. Microorganismos de los Alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico. Volumen I, Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F. y Debevere, J. 1999. Spoilage and safety of fresh-cut vegetables packaged under equilibrium modified atmosphere. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 64/5, 7-12.

- Jacxsens, L. Devlieghere, F., Ragaert, P., Vanneste, E. y Debevere, J. 2003. Relation between microbiological quality, production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *Int. J. Food Microbiol.*, 83, 263-280.
- Janssen, M. 1997. Contaminants. En: *Food Safety and Toxicity*. J. de Vries (ed), CRC Press, Boca Raton, pp. 53-74.
- Jason, A.C. 1983. A deterministic model for monophasic growth of batch cultures of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 513-536.
- Jay, J. 2000. *Microbiología moderna de los alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Jen, C.M. y Shelef, L.A. 1986. Factors affecting sensitivity of *Staphylococcus aureus* 196E to polyphosphates. *Appl. Environm. Microbiol.* 52, 842-846.
- Jeyamkondan, S., Jayas, D. y Holley, R. 2001. Microbial growth modeling with artificial neural networks. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 343-354.
- Jones, D. 1991. The genus *Brochothrix*. En: *The Prokaryotes*. Vol. II. 2nd edition. A. Balows, H.G. Trijper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (eds), Springer-Verlag, New York, pp. 1617-1628.
- Jones, J.E. 1993. A real time database/models base/expert system in predictive microbiology. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 268-272.
- Jones, M.V. 1989. Modified atmospheres. En: *Mechanisms of action of food preservation procedures*. G.W. Gould (ed), Elsevier Science Publishers Ltd., pp. 247-284.
- Jones, J.E., Walker, S.J., Sutherland, J.P., Peck, M.W. y Little, C.L. 1994. Mathematical modelling of the growth, survival and death of *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 433-447.
- Kakouri, A. y Nychas, G. 1994. Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 163-172.
- Kalchayanand, N., Frethem, C., Dunne, P., Sikes, A. y Ray, B. 2002. Hydrostatic pressure and bacteriocin-triggered cell wall lysis of *Leuconostoc mesenteroides*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 33-40.
- Kant-Muermans, M.L.T., Stekelenburg, F.K., Zwietering, M.H. y Huis in't Veld, J.H.J. 1997. En: *Modelling the shelf life of packed, cooked meat products*. World Congress on Food Hygiene, The Hague, The Netherlands, pp. 53-57.
- Kempton A. y Bobier S. 1970. Bacterial growth in refrigerated, vacuum-packed luncheon meats. *Can. J. Microbiol.*, 16, 287-197.
- Ko, R., Smith, L.T. y Smith, G.H. 1994. Glycine betaine confers advanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, 176, 426-431.
- Kohl, K. S. y Farley, T. A. 2000. Initially unrecognized distribution of a commercially cooked meat product contaminated over several months with *Salmonella serotype Infantis*. *Epidemiology and Infection*, 125, 491-498.
- Korkeala H. y Alanko T. 1988. The prediction of food-product shelf life. *Proc. 34th Int. Congr. Meat Sci. Technol.*, Brisbane, Australia, pp. 537-538.
- Korkeala, H. y Bjorkroth, K. 1997. Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *J. Food Prot.* 60, 724-731.
- Korkeala, H. y Lindroth, S. 1987. Differences in microbial growth in the surface layer and at the centre of vacuum-packed cooked ring sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 4, 105-110.
- Korkeala, H. y Mäkelä, P. 1989. Characterization of lactic acid bacteria from vacuum-packaged cooked ring sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 9, 33-43.
- Korkeala, H., Alanko, T. Mäkelä, P. y Lindroth, S. 1989. Shelf life of vacuum-packaged cooked ring sausages at different chill temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 9, 237-247.
- Korkeala, H., Alanko, T. Mäkelä, P. y Lindroth, S. 1990. Lactic acid and pH as indicators of spoilage for vacuum-packaged

- cooked ring sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 10, 245-254.
- Korkeala, H. Alanko, T. y Tiusanen, T. 1992. Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 33, 27-32.
- Korkeala, H. Lindroth, S., Ahvenainen, R. y Alanko, T. 1987. Interrelationship between different parameter on the spoilage of vacuum-packaged cooked ring sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 5, 311-321.
- Korkeala, H., Suortti, T. y Mäkelä, P. 1988. Ropy slime formation in vacuum packaged cooked meat products caused by homofermentative lactobacilli and a *Leuconostoc* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 7, 339-347.
- Kotzekidou, P. y Bloukas, J. 1996. Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Sci.*, 42, 333-345.
- Koutsoumanis, K. y Nychas, G.J.E., 2000. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *Int. J. Food Microbiol.*, 60, 171-184.
- Kovarova-Kovar, K. y Egli, T. 1998. Growth kinetics of suspended microbial cell: From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 646-666.
- Kramer, J.M. y Gilbert, R.J. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. En: *Foodborne Bacteria Pathogens*. M.P. Doyle (ed), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 22-70.
- Krist, A., Roos, T. y McMeekin, T.A. 1998. Final optical density and growth rate, effects of temperature and NaCl differ from acidity. *Int. J. Food Microbiol.*, 43, 195-203.
- Kroll, R.G. y Patchett, R.A. 1992. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 14, 224-227.
- Labuza, T.P. y Fu, B. 1993. Growth kinetics for shelf-life prediction theory and practice. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 309-323.
- Labuza, T.P. y Riboth, D. 1982. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technol.*, 36, 66-74.
- Labuza, T.P., Fu, B. y Taoukis, P.S. 1992. Prediction of shelf life and safety of minimally processed CAP/MAP chilled foods: a review. *J. Food Prot.*, 55, 743-750.
- Lack, W. K., Becker, B. y Holzapfel, W. H. 1997. Comparison of Standatd-I broth and lettuce juice as media for *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. Poster en Symposium International Quimper Froid'97, Quimper, Francia.
- Lamers, P.P. 1996. Food safety and product development. *Fleischwirtschaft*. 76, 1040-1041.
- Larmond, E. 1977. Laboratory methods for sensory evaluation of foods. Canadian Department Agr. Publications, 1637.
- Le Cun, Y., Denker, J. y Solla, S. 1990. Optimal brain damage. En: *Advances in neural information- processing systems 2*. D. S. Touretzky (Ed). San Mateo, CA: Morgan Kaufmann, pp. 598-605.
- Lebert, I., Robles-Olvera, V. y Lebert, A. 2000. Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas spp.* and *Listeria* in meat. *Int. J. Food Microbiol.*, 61, 27-39.
- Lee, H., Park, S. y Kim, J. 2000. Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species. *FEMS Microbiology Letters*, 193, 243-247.
- Lee, R.M., Hartman, P.A., Olson, D.G. y Williams, F.D. 1994. Metal ions reverse the inhibitory effects of selected food-grade phosphates in *Staphylococcus aureus*. *Journal Food Prot.* 57, 284-288.
- Leistner, L. y Gorris, L.G. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 41-46.
- Little, C.L. y de Louvois, J. 1998. The microbiological examination of butchery products and butchers' premises in the United Kingdom. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 177-186.
- Llaudes, M., Zhao, L., Duffy, S. y Schaffner, D.W. 2001. Simulation and modelling of the effect of small inoculum size on time to spoilage by *Bacillus*

- stearothermophilus*. Food Microbiol., 18, 395-405.
- Logue, C.M., Sheridan, J.J., Wauters, G., Mc Dowell, D.A. y Blair, I.S. 1996. *Yersinia spp.* and numbers, with particular reference to *Yersinia enterocolitica* bio/serotypes, occurring on Irish meat and meat products, and the influence of alkali treatment on their isolation. Int. J. Food Microbiol., 33, 257-274.
- López-Caballero, M. E., Carballo, J. y Jiménez-Colmenero, F. 1999. Microbiological changes in pressurized, prepackaged sliced cooked ham. J. Food Prot., 62, 1411-1415.
- Lubieniecki-von Schelhorn, M. 1975. Vermehrung und Absterben von Mikroorganismen in Abhängigkeit von Milieu unter besondere Berücksichtigung kombinierter technologischer Einflüsse. 4. Mitteilung. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 3, 138-147.
- Lück, E. y Jager, M. 1997. Common salt. En: Antimicrobial Food Additives. Springer-Verlag, Berlín, pp. 62-71.
- Lund, B.M. y Peck, M.W. 1994. Heat resistance and recovery of spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* in relation to refrigerated, processed foods with an extended shelf life. J. Appl. Bacteriol., 76, 115-128.
- Luño, M., Beltrán, J.A. y Roncalés, P. 1998. Shelf-life extension and colour stabilisation of beef packaged in a low atmosphere containing CO: loin steaks and ground meat. Meat Sci., 48, 75-84.
- Mackey, B.M. y Kerridge, A.L. 1988. The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of *Salmonellae* in minced beef. Int. J. Food Microbiol., 6, 57-65.
- Mäkelä, P. 1993. Lactic acid bacterial contamination at meat processing plants. Thesis, College of Veterinary Medicine, Helsinki.
- Mäkelä, P. y Korkeala, H. 1987. Lactobacilli contamination of cooked ring sausage processing plant. Int. J. Food Microbiol., 5, 323-330.
- Mäkelä, P., Korkeala, H.J. y Laine, J.J. 1992a. Ropy slime-producing lactic acid bacteria contamination at meat processing plants. Int. J. Food Microbiol., 17, 27-35.
- Mäkelä, P., Korkeala, H.J. y Laine, J.J. 1992b. Survival of ropy slime-producing lactic acid bacteria in heat processes used in the meat industry. Meat Sci., 31, 463-471.
- Mäkelä, P., Schillinger, U., Korkeala, H. y Holzapfel, W.H. 1992c. Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. Int. J. Food Microbiol., 16, 167-172.
- Man, J., Rogosa, M. y Sharpe, M. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., 23, 130-135.
- Marin, M.E., de la Rosa, M.C., Carrascosa, A.V. y Cornejo, I. 1992. Microbiological and physicochemical aspects of defective Spanish hams. Fleischwirtschaft. 72, 1600-1605.
- Marth, E.H. 1974. Fermentations. En: Fundamentals of Dairy Chemistry. Ed. B.H. Webb, A.H. Johnson y J.A. Alford. Capítulo 13. Westport, CT: AVI.
- Masson, Y., Ainsworth, P., Fuller, D. Bozkurt, H. y Ibanoglu S. 2002. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. J. Food Engineering. 54, 125-131.
- Mayeux, J., Sandine, W. y Elliker, P. 1962. A selected medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed strain starter cultures. J. Dairy Sci., 45, 655-656.
- McCann, T.L., Eifert, J.D., Gennings, C., Schilling M.W. y Carter, Jr. W.H. 2003. A predictive model with repeated measures analysis of *Staphylococcus aureus* growth data. Food Microbiol., 20, 139-147.
- McClure, P. J., Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T. M. y Roberts, T. A. 1993a. A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. Int. J. Food Microbiol., 19, 161-178.
- McClure, P.J., Beaumont, A.L., Sutherland, J.P. y Roberts, T.A. 1997. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes*: the effects on growth of

- NaCl, pH, storage temperature and sodium nitrate. *Int. J. Food Microbiol.*, 34, 221-232.
- McClure, P.J., Blackburn, C.W., Cole, M.B., Curtis, P.S., Jones, J.E., Legan, J.D., Ogden, I.D., Peck, M.W., Roberts, T.A., Sutherland, J.P. y Walker, S.J. 1994b. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food MicroModel approach. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 265-275.
- McClure, P.J., Cole, M.B., Davies, K.W. y Anderson, W.A. 1993b. The use of automated turbidimetric data for the construction of kinetic models. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 277-285.
- McClure, P.J., Cole, M.B. y Davies, K.W. 1994a. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 359-375.
- McDonald, K. y Sun, D.W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 52, 1-27.
- McMeekin, T.A. y Ross, T. 1996a. Modelling applications. *J. Food Prot.*, 59, 37-42.
- McMeekin, T.A. y Ross, T. 1996b. Shelf-life prediction: status and future possibility. *Int. J. Food Microbiol.*, 33, 65-83.
- McMeekin, T.A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D.S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Ross, T., Salter, M y Soontranon, S. 1997. Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerg. Infect. Dis.*, 3, 541-549.
- McMeekin, T.A., Chandler, R.E., Doe, P.E., Garland, C.D., Olley, J., Putro, S. y Ratkowsky, D.A. 1987. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *J. Appl. Bacteriol.*, 62, 543-550.
- McMeekin, T.A. Olley, J.N. Ross, T. y Ratkowsky, D.A. 1993. En: *Predictive Microbiology: theory and Application*. Research Studies Press Ltd., John Wiley and Sons, New York.
- McMeekin, T.A., Ratkowsky, D.A., Olley, J. y Ross, T. 1989. Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the Square Root model for predicting bacterial growth in foods – A reply to C. Adair et al. *Food Microbiol.*, 6, 304-308.
- McMeekin, T.A., Ross, T. y Olley, J. 1992. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.*, 15, 13-32.
- Miles, D.W., Ross, T., Olley, J. y McMeekin, T.A. 1997. Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 38, 133-142.
- Miller, A.J., Call, J.E. y Eblen, B.S. 1997a. Growth, injury and survival potential of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in brine chiller conditions. *J. Food Prot.*, 60, 1334-1340.
- Miller, A.J., Call, J.E. y Whiting, R.C. 1993. Comparison of organic acid salts for *Clostridium botulinum* control in an uncured turkey products. *J. Food Prot.* 56, 958-962.
- Miller, A. J., Smith, J. L. y Buchanan, R. L. 1998. Factors affecting the emergence of new pathogens and research strategies leading to their control. *J. Food Saf.*, 18, 243-263.
- Mittal, G. y Zhang, J. 2000. Prediction of freezing time for food products using a neural network. *Food Research Int.*, 33, 557-562.
- Mol, J.H.H., Hietbrink, J.E.A., Mollen, H.W.M. y van Tinteren, J. 1971. Observations on the microflora of vacuum packed sliced cooked meat products. *J. Appl. Microbiol.*, 34, 377-397.
- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.*, 3, 371-394.
- Morita, K., Kubota, K. y Aishima, T. 2002. Investigating sensory characteristics and volatile components in boiled scallop aroma using chemometric techniques. *Food Chemistry*, 78, 39-45.
- Muermans, M.L.T., Stekelenburg, F.K., Zwietering, M.H. y Huis in Veld, J.H.J. 1993. Modelling of the microbiological quality of meat. *Food Control*, 4, 216-221.

- Mukherji, S. y Qvist, S. 1981. The impact of *Brochothrix thermosphacta* and acid lactic bacteria on the keeping quality of vacuum-packaged vienna sausages. En: Roberts T.A., Hobbs E., Christian J., Skovgaard N. (ed.), Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. Academic Press, London, pp. 231-239.
- Murano, E. A., Murano, P. S., Brennan, R. E., Shenoy, K. y Moreira, R. G. 1999. Application of high hydrostatic pressure to eliminate *Listeria monocytogenes* from fresh pork sausage. J. Food Prot., 62, 480-483.
- Murphy, P.M., Rea, M.C. y Harrington, D. 1996. Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in a skim milk medium and validation studies in a range of dairy products. J. Appl. Bacteriol., 80, 557-564.
- Muyanja, C.M., Narvhus, J.A., Treimo, J. y Langsrud T. 2002. Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. Int. J. Food Microbiol., 81, 201-210.
- Najjar, Y., Basheer, I., Hajjmer, M. 1997. Computational neural networks for predictive microbiology: I. Methodology. Int. J. Food Microbiol., 34, 27-49.
- Nassu, R.T., Aparecida, L., Goncalves, G., Aparecida, M., Pereira da Silva, A. y Beserra, F.J. 2003. Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. Meat Sci., 63, 43-49.
- Nauta, M.J., Litman, S., Barker, G.C. y Carlin, F. 2003. A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*. Int. J. Food Microbiol., 83, 205-218.
- Nerbrink, E., Borch, E. Blom, H. y Nesbakken, T. 1999. A model based on absorbance data on the growth rate of *Listeria monocytogenes* and including the effects of pH, Na Cl, Na-lactate and Na-acetate. Int. J. Food Microbiol., 47, 99-109.
- Neumeyer, K. 1994. Predicting spoilage. En: Quality Quarterly Winter, 1-3, Dairy Industry Quality Centre, NSW Australia.
- Neumeyer, K., Ross, T. y McMeekin, T.A. 1997a. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage *Pseudomonads*. Int. Food Microbiol., 38, 45-54.
- Neumeyer, K., Ross, T. Thomson, G. y McMeekin, T.A. 1997b. Validation of a model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychrotrophic pseudomonads. Int. Food Microbiol., 38, 55-63.
- Newton, K. y Gill, C. 1978. The development of the anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. J. Appl. Bacteriol., 44, 91-95.
- Newton, K. y Rigg, W. 1979. The effect of film permeability on the storage life and microbiology of vacuum packaged meat. J. Appl. Bacteriol., 47, 433-441.
- Nichols, G., McLauchlin, J. y De LOuvois, J. 1998. The contamination of paté with *Listeria monocytogenes*- Results from the 1994 European Community-Coordinated Food Control Program for England and Wales. J. Food Prot. 61, 1299-1304.
- Nielsen, H. 1983. Influence of temperature and gas permeability of packaging film on development and composition of microbial flora in vacuum-packed bologna-type sausage. J. Food Prot., 46, 693-698, 701.
- Noriega, M^aJ. 1999. Aplicación de las Redes Neuronales en el análisis sensorial de los alimentos. Alimentaria, septiembre, 67-72.
- Norma Española UNE 87-001-94. 1997. AENOR. Análisis sensorial. Tomo 1- Alimentación. Recopilación de Normas UNE. Edita: AENOR. Madrid, España., 1-36.
- Norma Española UNE 87-004-79. 1997. AENOR. Análisis sensorial. Tomo 1- Alimentación. Recopilación de Normas UNE. Edita: AENOR. Madrid, España., 1-6.
- Norma Española UNE 87-008-92. 1997. AENOR. Análisis sensorial. Tomo 1- Alimentación. Recopilación de Normas UNE. Edita: AENOR. Madrid, España., 1-20.

- Olvera, R.V., Begot, C., Lebert, I. Y Lebert, A. 1999. An original device to measure bacterial growth on the surface of meat at relative air humidity close to 100%. *J. Food Eng.* 38, 425-437.
- Orden de 29 Junio 1983 de la Presidencia del Gobierno. Normas de calidad para jamón cocido y fiambre de jamón, paleta cocida y fiambre de paleta y magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo. BOE 5 julio 1983, núm. 159/1983, p. 18679.
- Oscar, T.P. 1997. Predictive modelling for risk assessment of microbial hazards. En: Reciprocal Meat Conference Proceedings. Kansas USA, American Meat Science Association, 50, pp. 98-103.
- Oscar, T.P. 1998. The development of a risk assessment model for use in the poultry industry. *J. Food Saf.*, 18, 371-381.
- Otremba, M.M., Dikeman, M.E. y Boyle, E.A. 1999. Refrigerated shelf life of vacuum-packaged, previously frozen ostrich meat. *Meat Sci.*, 52, 279-283.
- Owens, J D., Thomas, D.S., Thompson, P.S. y Timmerman, J.W. 1989. Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric enumeration of microbial populations. *Lett. Appl. Microbiol.*, 9, 245-249.
- Papa, F. 1988. Selective medium for lactobacilli causing green discoloration in cooked cured/meat products. *Industria Conserve.* 63, 146-148.
- Papadopoulos, L.S., Miller, R.K., Acuff, G.R., Vanderzant, C. y Cross, H.R. 1991. Effect of sodium lactate on microbial and chemical composition of cooked beef during storage. *J. Food Sci.* 56, 341-347.
- Parry, R.T. 1993. Introduction. En: Principles and Application of Modified Atmosphere Packaging of Food. R.T. Parry (ed). Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp. 1-18.
- Parry, R.T. 1995. Introducción En: Parry, R.T. (Coordinador). Madrid Vicente (eds.), Envasado de los alimentos en atmósfera modificada. Madrid, España, pp. 13-31.
- Pascual Anderson, M^aR. y Calderón Pascual, V. 2000. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. 2^a Edición. Díaz de Santos (Ed.), Madrid, pp. 33-92.
- Penney, N., Hagyard, C.J. y Bell, R.G. 1993. Extension of shelf life of chilled, sliced roast beef by carbon dioxide packaging. *Int. J. Food Sci. Technol.* 28, 181-191.
- Pexara, E.S., Metaxopoulos, J. y Drosinos, E.H. 2002. Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages- "piroski"- stored under vacuum and modified atmospheres at +4 and +10° C. *Meat Sci.*, 62, 33-43.
- Phillips, J.D. y Griffiths, M.W. 1987. The relation between temperature and growth of bacteria in dairy products. *Food Microbiol.*, 4, 173-185.
- Pikul, J., Holownia, K., Cegielska-Radziejewska, R. y Kijowski, J. 1997. Effect of packaging method and refrigerated storage time on the quality and shelf life of breaded poultry products. *Chłodnictwo* 32, 41-45.
- Pin, C. y Baranyi, J. 1998. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.*, 41, 59-72.
- Pin, C., Sutherland, J.P. y Baranyi, J. 1999. Validating predictive models of food spoilage organisms. *J. Appl. Microbiol.*, 87, 491-499.
- Pooni, G.S. y Mead, G.C. 1984. Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf life of non-frozen poultry meat products. *Food Microbiol.*, 1, 67-78.
- Presser, K.A., Ross, T. y Ratkowsky, D.A. 1998. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1773-1779.
- Ratkowsky, D.A. 1993. Principles of nonlinear regression modelling. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 195-199.
- Ratkowsky, D.A. y Ross, T. 1995. Modeling the bacterial no growth interface. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20, 29-33.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N. y Chandler, R.E. 1983. Model for bacterial culture

- growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.*, 154, 1222-1226.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A. y Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.*, 149, 1-5.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A. y Olley, J. 1991. Comparison of Arrhenius type and Bełhradec models for prediction of bacterial growth in foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 452-459.
- Regan, C.M.; Syed, Q. and Tunstall, P.J. 1995. A hospital outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning-implications for food hygiene review in hospitals. *The Journal of Hospital Infection*, 29, 69-73.
- Reuter, G. 1970. Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischwaren, 4. Mitteilung: Die Ökologie van Laktobazillen, *Leuconostoc-Species* und *Pediokokken*. *Fleischwirtschaft*. 50, 1397-1399.
- Rhodehamel, E.J., Reddy, N. y Pierson, M.D. 1992. Botulism: the causative agent and its control in foods. *Food Control*. 3, 125-143.
- Riordan, D.C., Duffy, G., Sheridan, J.J., Shawn Eblen, B., Whiting, R.C., Blair, I.S. y McDowell, D.A. 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture of pepperoni. *J. Food Prot.*, 61, 146-151.
- Roberts, T.A. 1989. Combinations of antimicrobials and processing methods. *Food Technol.*, 43, 156-163.
- Roberts, T.A. 1997. Microbial growth and survival: developments in predictive modelling. *Food Technol.*, 51, 88-90.
- Roberts, T.A., Baird-Parker, A. y Tompkin, R. 1996. *Listeria monocytogenes*. En: *Microorganisms in Foods 5. Microbiological specifications of food pathogens*. Blackie Academic & Professional, pp. 141-182.
- Roberts, T.A., Pitt, J.I., Farkas, J. y Gran, F.H. 1998. *Microorganisms in Foods 6, Microbial ecology of food commodities*, chapter 1: Meat and meat products. ICMSF, Blackie Academic & Professional, pp. 1-74.
- Robins, M., Brocklehurst, T. y Wilson, P. 1994. Food structure and the growth of pathogenic bacteria. *Food Technology International Europe*, pp. 31-36.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J. Kaloti, A. y Mackey, B.M. 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 44, 83-92.
- Rodríguez-Pérez, M^aR., Zurera-Cosano, G., García-Gimeno, R.M^a, Barco-Alcalá, E. y Castillejo-Rodríguez, A.M^a. 2003. Sensory and microbiological quality evaluation of vacuum-packed sliced cooked chicken breast. Shelf-life estimation. *J. Food Quality*, 26, 105-122.
- Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M. y Fletcher, H. 2002. Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Sci.*, 62, 165-177.
- Ross, T. 1993a. A philosophy for development of kinetic models in predictive microbiology. PhD Thesis, University of Tasmania, Hobart, Australia.
- Ross, T. 1993b. Bełhradec-type models. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 180-189.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol.*, 81, 501-508.
- Ross, T. 1999. Predictive food microbiology models in the meat industry. *Meat and Livestock Australia*, Sydney, Australia, pp. 196.
- Ross, T. y McMeekin, T.A. 1991. Predictive microbiology: Applications of a square root model. *Food Aust.*, 43, 202-207.
- Ross, T. y McMeekin, T.A. 1995. Predictive microbiology and HACCP. En: *Advances in Meat Research: HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing 10*, Chapman and Hall, UK, pp. 330-357.
- Ross, T., Dalgaard, P. y Tienungoon, S. 2000a. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 231-245.
- Ross, T., McMeekin, T.A. y Baranyi, J. 2000b. Predictive microbiology and food safety. En: *Encyclopedia of Food*

- Microbiology. R.K. Robinson, C.A. Batt and P.D. Patel (eds), Academic Press, San Diego, pp. 1699-1710.
- Ross, T., Neumeier, K., Kamperman, N.L. y McMeekin, T.A. 1993. In defence of predictive microbiology. *Aust. Microbiol.*, 7, 103-107.
- Ruiz, J.A., Guerrero, L., Arnau, J., Guardia, M.D., Esteve-García, E. 2001. Descriptive sensory analysis of meat from broilers fed containing vitamin E or beta-carotene as antioxidants and different supplemental fats. *Poultry Sci.*, 80, 976-982.
- Sakala, R.M., Hayashidani H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C. y Ogawa, M. 2002. Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *Int. J. Food Microbiol.*, 74, 87-99.
- Samelis, J. y Georgiadou, K.G. 2000. The microbial association of Greek taverna sausage stored at 4 and 10 degrees C in air, vacuum or 100% carbon dioxide and its spoilage potential. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 58-68.
- Samelis, J. y Metaxopoulos, J. 1998. The microbiology of traditional greek contry-style sausage during manufacture followed by storage at 3° and 12° C in air. *Ital. Journal Food Sci.* 2, 155-163.
- Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K. G. y Metaxopoulos, J. 1998. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *J. Appl. Microbiol.*, 84, 649-660.
- Samelis, J., Kakouri, A. y Rementzis, J. 2000a. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominatingg the spoilage microbial association of cooked meats at 4° C. *Food Microbiol.*, 17, 329-340.
- Samelis, J., Kakouri, A. y Rementzis, J. 2000b. The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. *Int. J. Food Microbiol.*, 56, 133-143.
- Sameshima, T., Takeshita, K., Akimoto, M., Yamanaka, H., Miki, T., Arihara, K., Itoh, M. y Kondoh, Y. 1997. Effect of various sugars on the swelling spoilage of cooked meat products caused by heterofermentative lactic acid bacteria. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology*, 44, 855-861.
- Sandine, W.E., Radich, P.C y Elliker, P.R. 1972. Ecology of the lactic streptococci: A review. *Journal Milk of Food Technology*, 35, 176-185.
- Schaffner, D.W. 1995. The application of the WLF equation to predict lag time as a function of temperature for three psychrotrophic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 27, 107-115.
- Schillinger, U. y Lücke, F.K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.*, 4, 199-208.
- Schoolfield, R.M., Sharpe, P.J.H. y Magnuson, C.E. 1981. Non-linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. *J. Theor. Biol.*, 88, 719-731.
- Scott, W. 1937. The growth of microorganisms on ox muscle. II: The influence of temperatura. *J. Council Scient. Ind. Res. Australia*, 9, 177-190.
- Serra, J.A., Domenech, E., Escriche, I. y Martorell, S. 1999. Risk assessment and critical control point from the production perspective. *Int. J. Food Microbiol.*, 46, 9-26.
- Sharpe, P.J. y De Michele, D.W. 1977. Reaction kinetics and poikilotherm development. *J. Theor. Biol.*, 64, 649-670.
- Shearer, A.E.H., Mazzotta, A.S. Chuyate, R. y Gombas, D.E. 2002. Heat resistance of juice spoilage microorganisms. *J. Food Prot.*, 65, 1271-1275.
- Shelef, L.A. 1994. Antimicrobial effects of lactates. *J. Food Prot.* 57, 445-450.
- Silla, H. y Simonsen, B. 1985. Shelf- life of cured, cooked and sliced meat products. I. Influence of composition, vacuum packaging and modified atmospheres. *Fleischwirtschaft*, 65, 66-69, 116-121.
- Skinner, G.E., Larkin, J.W. y Rhodehamel, E.J. 1994. Mathematical

- modelling of bacterial growth. *J. Food Safety*, 14, 175-217.
- Smith, L.T. 1996. Role of osmolytes in adaptation of osmotically stressed and chill-stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed meat surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3088-3093.
- Smith, M.G. 1985. The generation time, lag time, and minimum temperature of growth of coliform organisms on meat, and implication for codes of practice in abattoirs. *J. Hyg. (Cambridge)*, 94, 289-300.
- Smith, M.G. 1987. Calculation of the expected increases of coliform organisms, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, in raw blended mutton tissue. *Epidemiol. Infect.*, 99, 323-331.
- Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. y Holt, J. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Sneath, P., Staley, J., Brenner, D., Holt, J., Castenholz, R., Schleifer, K., Tully, J., Ursing, J. y Williams, S. 1991. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9ª ed, Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Sorheim, O., Nissen, H. y Nesbakken, T. 1999. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. *Meat Sci.*, 52, 157-164.
- Soriano, J.M.; Rico, H.; Moltó, J.C. y Mañes, J. 2000. Microbial evaluation of Spanish potato omelette and cooked meat samples in University restaurants. *J. Food Prot.*, 63, 1273-1276.
- Stainer, R., Ingraham, J., Wheelis, M. y Painter, P. 1992. *Microbiología*, 2ª Edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, pp. 530-540.
- Standard, C.J., Williams, A.P. y Gibbs, P.A. 1985. Temperature growth relationships for psychrotrophic food spoilage bacteria. *Food Microbiol.*, 2, 155-162.
- Stecchini, M.L., Del Torre, M., Sarais, I., Saro, O., Messina, M. y Maltini, E. 1998. Influence of structural properties and kinetic constraints on *Bacillus cereus* growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1075-1078.
- Stella, S., Cattaneo, P. Y Cantoni, C. 2001. The ammoniacal alteration of bresaola. *Ingegneria Alimentare le Conserve Animali*. 17, 17-18.
- Stiles, M.E. 1991. Scientific principles of controlled/modified atmosphere packaging. En: Ooraikul, B. Y Stiles, E. (Eds.), *Modified Atmosphere Packaging of Food*. Chichester, Reino Unido: Ellis Horwood Ltd., pp. 18-25.
- Stiles, M.H. y Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36, 1-29.
- Stojanowic, V. y Flemming, R. 1988. *Fleischwirtsch*, 68, 958.
- Stone, H. y Sidel, J. 1993. *Sensory Evaluation Practices*. Academia San Diego (2ª Ed.).
- Stone, H., Sidel, J., Oliver, S., Woolsey, A. y Singleton, R. 1974. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technol.*, 28, 24-34.
- Susiluoto, T., Korkeala, H. y Björkroth, J. 2003. *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strips on sell-by-day. *Int. J. Food Microbiol.*, 80, 89-97.
- Sutherland, J. P., Aherme, A. y Beaumont, A. L. 1996. Preparation and validation of a growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. *Int. J. Food Microbiol.*, 30, 359-372.
- Sutherland, J.P., Bayliss, A.J. y Braxton, D.S. 1997. Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: Inclusion of carbon dioxide as a fourth factor in a pre-existing model. *Int. J. Food Microbiol.*, 37, 113-120.
- Sutherland, J. P., Bayliss, A. J. y Roberts, T. A. 1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.*, 21, 217-236.
- te Giffel, M. C. y Zwietering, M. H. 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 46, 135-149.

- Todd, E.C. 1997. Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review, World Health Statistics Quarterly. Rapport Trimestriel de Statistiques Sanitaires Mondiales, 50, 30-50.
- Torre- Hernández, P. 2000. Bases científicas del análisis sensorial. Alimentaria, enero-febrero, 155-164.
- Tsakalidou, E., Samelis, J., Metaxopoulos, J. y Kalantzopoulos, G. 1997. Atypical *Leuconostoc*-like *Weissella* strains isolated from meat, sharing low phenotypic relatedness with the so far recognized arginine-negative *Weissella spp.* as revealed by SDS-PAGE of Whole Cell Proteins. System. Applied Microbiology, 20, 659-664.
- Uyttendaele, M., De Troy, P. y Debevere, J. 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. Int. J. Food Microbiol., 53, 75-80.
- Valero, M. y Salmerón, M.C. 2002. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. Int. J. Food Microbiol., Aceptado para publicación: 9 octubre 2002.
- Valero, M., Fernández, P.S. y Salmerón, M.C. 2003. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. Int. J. Food Microbiol., 82, 71-79.
- Valik, L. y Pieckova, E. 2001. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. Int. J. Food Microbiol., 63, 11-17.
- Van Boekel, M.A. 1996. Statistical aspects of kinetic modelling for food science problems. J. Food Sci., 61, 477-485.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., De Baerdemaeker, J. y Vanderwalle, J. 1992. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. Appl. Environ. Microbiol., 58, 2901-2909.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Schellekens, M., Martens, T. y De Baerdemaeker, J. 1995. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. Int. J. Food Microbiol., 25, 227-249.
- Van Impe, J.F., Versyck, K.J. y Geeraerd, A.H. 1996. Validation of predictive models: definitions and concepts. En: COST 914. Predictive modelling of microbial growth and survival in foods. Luxemburgo. Oficina de publicaciones oficiales de la Comunidad Europea, 1999, pp. 31-38.
- Vereecken, K., Bernaerts, K., Boelen, T., Dens, E., Geeraerd, K., Verseyck, K. y Van Impe, J. 1998. State-of-the-art in predictive food microbiology. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 63/4b, 1429-1438.
- von Holy, A., Cloete, T.E. y Holzapfel, W.H. 1991. Quantification and characterisation of microbial populations associated with spoiled, vacuum-packaged Vienna sausages. Food Microbiol., 8, 95-104.
- Voyer, R. y McKellar, R.C. 1993. MKES tools: a microbial kinetics expert system for developing and assessing food production systems. J. Ind. Microbiol., 12, 256-262.
- Waite, W. M. 1988. Meat microbiology: a reassessment. En: Lawrie, R. (Ed.), Developments in Meat Science-4. London: Elsevier Applied Science, pp. 317-333.
- Walls, I. y Scott, V. 1996. Validation of predictive mathematical models describing the growth of *E. coli* O157: H7 in raw ground beef. J. Food Prot., 59, 1331-1335.
- Walls, I. y Scott, V. 1997. Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. Int. J. Food Microbiol., 36, 97-102.
- Walls, I., Scott, V.N. y Bernard, D.T. 1996. Validation of predictive mathematical models describing growth of *Staphylococcus aureus*. J. Food Prot., 59, 11-15.
- Whiting, R.C. 1995. Microbiological modeling. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35, 467-494.
- Whiting, R.C. 1997. Microbial database building: what have we learned? Food Technol., 51, 82-87.
- Whiting, R.C. y Buchanan, R.L. 1993. A classification of models for predictive microbiology. Food Microbiol., 10, 175-177.
- Whiting, R.C. y Buchanan, R.L. 1994. Microbial modelling. Food Technol., 48, 113-120.

- Whiting, R.C. y Buchanan, R.L. 2001. Cap. IX Técnicas avanzadas en microbiología de alimentos. Modelización predictiva. En: Doyle, Beuchat y Montville (eds.). Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras. Acribia, Zaragoza, pp. 761-772.
- Whiting, R.C. y Cygnarowicz Provost, M. 1992. Model for quantifying bacterial growth. *Food Microbiol.*, 9, 269-277.
- Whiting, R.C. y Masana, M.O. 1994. *Listeria monocytogenes* survival model validated in simulated uncooked-fermented meat products for effects of nitrite and pH. *J. Food Sci.*, 59, 760-762.
- Wijtztes, T., McClure, P.J., Zwietering, M.H. y Roberts, T.A. 1993. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 18, 139-149.
- Wijtztes, T., Rombouts, F.M., Kant-Muermans, M.L.T., van't Riet, K. y Zwietering, M.H. 2001. Development and validation of a combined temperature, water activity, pH model for bacterial growth rate of *Lactobacillus curvatus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 63, 57-64.
- Williams, M.L., Landel, R.F. y Ferry, J.D. 1955. The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous polymers and other glass forming liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3701-3707.
- Williams, T. 1992. En: The Principles Involved in the Determination of Product Shelf-life, Leatherhead Food Research Association, UK.
- Witting de Penna, Q. 1981. Evaluación sensorial, una metódica que mide calidad. II. Evaluación de Calidad mediante el Test de Valoración con Escala de Karlsruhe. *Alimentos* 6, 25-31.
- Woods, L.F.J. y Wood, J.M. 1982. A note on the effect on nitrite inhibition on the metabolism of *Clostridium botulinum*. *J. Appl. Microbiol.*, 52, 109-110.
- Woods, L.F.J., Wood, J.M. y Gibbs, P.A. 1981. The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system of *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. *Journal Gen. Microbiology*, 125, 399-406.
- Young, L.L., Reviere, R.D. y Cole, A.B. 1988. Fresh red meats: a place to apply modified atmospheres. *Food Technol.*, 42, 65-69.
- Zaika, L.L., Phillips, J.G., Fanelli, J.S. y Scullen, O.J. 1998. Revised model for aerobic growth of *Shigella flexneri* to extend the validity of predictions at temperatures between 10 and 19° C. *Int. J. Food Microbiol.*, 41, 9-19.
- Zhang, G. y Holley, R.A. 1999. Development and PFGE monitoring of dominance among spoilage lactic acid bacteria from cured meats. *Food Microbiol.*, 16, 633-644.
- Zhao, Y., Wells, J.H. y McMillin, K.W. 1994. Application of dynamic modified atmosphere packaging systems for fresh red meats. *Journal Muscle Foods*, 5, 299-328.
- Zurera-Cosano, G., Rincon-León, F., Moreno-Rojas, R. y Pozo-Lora, R. 1988. Microbial growth in vacuum packaged frankfurters produced in Spain. *Food Microbiol.*, 5, 213-218.
- Zwietering, M.H. y Hasting, A.P. 1997a. Modelling the hygienic processing of foods—a global process overview. *Trans. Chem. E.*, 75, 159-167.
- Zwietering, M.H. y Hasting, A.P. 1997b. Modelling the hygienic processing of foods— influence of individual process stages. *Trans. Chem. E.*, 75, 168-173.
- Zwietering, M.H., Cuppers, H.G., de Witt, J.C. y Van't Riet, K. 1994a. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 195-203.
- Zwietering, M.H., De Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C. y Van't Riet, K. 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1094-1101.
- Zwietering, M.H., De Witt, J.C. Cuppers, H.G. y Van't Riet, K. 1994b. Modelling of bacterial growth with shifts in temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 204-213.
- Zwietering, M.H., De Wit, J.C. y Notermans, S. 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised

milk at the time of consumption. *Int. J. Food Microbiol.*, 30, 55-70.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. y Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1875-1881.

Zwietering, M.H., Rombouts, F.M. y Van't Riet, K. 1993. Some aspects of modelling microbial quality of food. *Food Control.*, 4, 89-96.

Zwietering, M.H., Wijtzes, T., de Wit, J.C. y Van'T Riet, K. 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Food Prot.* 55, 973-979.

